UNIVERSITÉ DE STRASBOURG – FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1933-1934 N° 103

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES ACTINOMYCOSES

LE CYCLE ÉVOLUTIF DES ACTINOMYCES DANS LES CULTURES ET DANS L'ORGANISME ANIMAL

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le 16 décembre 1933
A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG
pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention PHARMACIE)

par

PIERRE MONAL
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse :

MM. A. SARTORY, *PROFESSEUR, PRÉSIDENT*
Y. VOLMAR „
R. SARTORY, Chargé des fonctions d'Agrégé } *JUGES*

STRASBOURG
IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1933

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG – FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1933-1934 N° 103

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES ACTINOMYCOSES

LE CYCLE ÉVOLUTIF DES ACTINOMYCES DANS LES CULTURES ET DANS L'ORGANISME ANIMAL

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le 16 décembre 1933
A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG
pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention PHARMACIE)

par

PIERRE MONAL
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse:

MM. A. SARTORY, *PROFESSEUR, PRÉSIDENT*
Y. VOLMAR „
R. SARTORY, Chargé des fonctions d'Agrégé } *JUGES*

STRASBOURG
IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1933

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. LOBSTEIN, *Doyen*, ✻, ✻, I. ✪, ✪
A. SARTORY, *Assesseur*, C. ✻, I. ✪, C. ✪.
CUVIER, *Secrétaire*, A. ✪

DOYEN HONORAIRE

M. JADIN, O. ✻, I. ✪, ✪

PROFESSEURS

MM.	N.	Pharmacie chimique.
	A. SARTORY, C. ✻, I. ✪, C. ✪.	Bactériologie.
	LAVIALLE, I. ✪, ✪	Botanique.
	N.	Chimie organique
	VOLMAR, I. ✪	Analyse chimique.
	LOBSTEIN, ✻, ✻, I. ✪, ✪	Matière médicale.
	GUILLAUME, ✻, ✻, I. ✪, ✪ ..	Pharmacie galénique

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. BRÆMER, ✻, I. ✪, O. ✪
JADIN, O. ✻, I. ✪, ✪

CHARGÉ DES FONCTIONS D'AGRÉGÉ

M. R. SARTORY, ✪

COURS COMPLÉMENTAIRES

MM.	N.	Chimie biologique.
	VOLMAR, I. ✪	Chimie minérale.
	LOBSTEIN, ✻, ✻, I. ✪, ✪	Hydrologie et Hygiène.
	GUILLAUME, ✻, ✻, I. ✪, ✪ ..	Zoologie.
	R. SARTORY ✪	Cryptogamie.
	COLLARD, I. ✪, ✻	Toxicologie.
	LAPP, A. ✪	Physique.
	BRÆMER, ✻, I. ✪, O. ✪	Législation et Déontologie

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	COLLARD, I. ✪, ✪	Chimie et Physique.
	R. SARTORY, ✪	Bactériologie et Parasitologie.
	LAPP, A. ✪	Chimie pharmaceutique.
	BOHN, A. ✪	Histoire naturelle.

A MES PARENTS

Témoignage d'affectueuse reconnaissance

A MES SŒURS
A MES FRÈRES
A MES BEAUX-FRÈRES

Témoignage de vive affection

A MES AMIS

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552728_0062

Au Président du Jury de ma Thèse

A Monsieur A. SARTORY

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
Commandeur de la Légion d'honneur

A mes Juges:

Monsieur Y. VOLMAR

Professeur à la Faculté de Pharmacie
de Strasbourg

Monsieur R. SARTORY

Chargé des fonctions d'Agrégé
à la Faculté de Pharmacie
de Strasbourg

Hommage de respectueuse
et profonde gratitude

INTRODUCTION.

La croyance naïve dans la stabilité des formes de la nature a toujours dû céder devant la notion scientifique que tout ce qui existe passe par une évolution naturelle, constante et progressive.

La synthèse des principes de morphologie comparée des organismes, constitue par contre un fait purement logique basé sur des lois diamétralement opposées à celles qui régissent la Biologie et résultant d'une accumulation d'observations enregistrées et classées.

La dérivation hypothétique des êtres vivants actuels à partir de ceux qui existaient antérieurement, a été nommée par HÆCKEL : science de l'évolution phylogénétique ou *Phylogénie*. Mais chaque être issu d'un être semblable, suit lui-même, pour atteindre l'état adulte, une évolution individuelle, désignée par HÆCKEL sous le terme d'évolution ontogénétique ou *Ontogénie*. En outre, l'évolution ontogénétique d'un individu peut se composer de plusieurs stades nettement délimités et à propriétés individuelles fixées; chaque individu, par exemple un insecte, peut suivre un cycle évolutif, appelé *Cyclogénie*.

L'unité apparente d'un *individu bactérien* et ses manifestations reproductrices constituent seulement un fait illusoire. D'après LŒHNIS et ENDERLEIN, la bactériologie est la science, qui rend manifeste les lois fondamentales de la création organique basée à la fois sur l'ontogénie, la cyclogénie et la phylogénie.

Afin de vérifier ces théories, A.-Ch. et G. HOLLANDE ont entrepris tout récemment une série de recherches nouvelles par lesquelles ils ont pu établir :

a) la structure cytologique des cellules microbiennes chez des espèces pathogènes pour l'homme.

b) la formation de la spore.

c) l'apparition de phénomènes sexués.

d) les formes sous lesquelles se présentent des ultra-virus ou virus filtrants.

Lors de ces travaux, les auteurs arrivent entre autres, aux conclusions suivantes :

« Le bacille tuberculeux est plus proche parent des champignons que des bactéries proprement dites. C'est avec juste raison qu'on le range parmi les Actinomycétées. »

« Dans le cycle évolutif des divers microbes étudiés, nous n'avons pas observé la formation du symplasme de Löhnis. »

« Les formes microbiennes dites « formes d'involution », paraissent correspondre aux formes monstrueuses mentionnées au cours de notre travail. »

Dans un travail semblable, Lucksch, utilisant le bacille de Koch et des *Actinomyces*, arrive par contre aux conclusions suivantes :

« Nous avons pu démontrer qu'il existe des *Actinomyces*,
« proches parents du bacille de Koch, sous une forme fil-
« trable à l'état de granulations. »

« Par analogie avec les faits observés chez les *Actino-*
« *myces*, il faut admettre qu'aussi les petites granulations du
« *bacille tuberculeux*, formes des symplasmes, évoluent ensuite
« par bourgeonnement. Cette théorie semble prouvée aussi
« par le fait de l'existence de granulations réunies en colonie
« dans les organes de cobayes inoculés au moyen de filtrats
« de crachats tuberculeux. »

A. et R. Sartory et J. Meyer avaient pu mettre en évidence l'existence de formes filtrables d'*Actinomyces* pathogènes. Les auteurs ont pu isoler au moyen des techniques spéciales un stade Gram négatif de la *Microsiphonée*. D'autre part, dans un travail très documenté et réalisé dans les laboratoires du professeur Sartory, Antonioli a prouvé la formation de formes très caractéristiques et se reproduisant par voie sexuée.

Notre cher Maître, Monsieur le Professeur A. SARTORY nous a donc conseillé de continuer les travaux sur la multiplication des *Actinomyces*, sur leur cycle évolutif éventuel et d'essayer d'éclaircir les quelques points de discordance entre les observations de LUCKSCH d'un côté et de HOLLANDE de l'autre.

Pour mener à bien ces problèmes, nous avons entrepris ce travail. Notre mémoire se divise en trois parties : dans la première, nous faisons l'historique de la question; dans la seconde, nous exposons nos travaux personnels.

Nous donnons d'abord l'historique des travaux antérieurs sur les microbes ultrafiltrants et leur cycle évolutif. Le chapitre II comprend le résumé des techniques et la description des appareils utilisés pour l'ultrafiltration; nous y envisageons également les lois fondamentales du problème de la diffusion et de la filtration.

La deuxième partie de notre mémoire se compose de quatre chapitres : le premier comprend la description de nos recherches préalables en vue de la confection des ultrafiltres et de l'adaptation des différents procédés à nos besoins.

Le chapitre II contient le rapport fidèle de nos expériences destinées à mettre en évidence le cycle évolutif des *Actinomyces* dans les cultures pures, après passage à travers l'ultrafiltre de collodion. Un schéma rédigé sous forme de tableau, exprime avec beaucoup de clarté les résultats que nous avons observés au cours de ces recherches.

Dans le chapitre III, nous donnons les observations de nos deux malades atteints d'*Actinomycose atypique*. Puis, nous déterminons le parasite cryptogamique isolé des prélèvements pathologiques au moyen de techniques culturales spéciales. Les propriétés morphologiques et biologiques sont étudiées afin de pouvoir permettre la classification systématique du champignon pathogène isolé.

Le dernier chapitre a trait à l'étude du cycle évolutif de l'*Actinomyces*, issu de souches pathogènes ou culturales, ultrafiltrantes, dans l'organisme animal. Un tableau résume aussi à la fin de ce chapitre les résultats obtenus par le passage successif de l'*Actinomyces* en étude à travers plusieurs séries de cobayes.

Nous terminons notre travail par une troisième partie donnant nos conclusions générales.

Quelques clichés et microphotographies donnent mieux que toutes les descriptions les faits caractéristiques du cycle évolutif tel que nous l'avons pu observer chez notre *Actinomyces*.

Nous tenons à exprimer ici toute notre gratitude à Monsieur le Professeur A. SARTORY, qui a bien voulu nous accueillir si cordialement dans son service merveilleusement outillé pour la recherche. Sa grande expérience et sa haute compétence nous ont beaucoup facilité notre tâche; il nous a d'ailleurs témoigné la plus grande bienveillance et nous l'assurons de toute notre vive reconnaissance.

Nous adressons également l'expression de notre respect à Monsieur le Professeur VOLMAR, ainsi qu'à Monsieur René SARTORY, Chargé des fonctions d'Agrégé, qui ont accepté, tous deux, de faire partie de notre Jury de thèse.

Nous devons aussi de vifs remerciements à Monsieur Jacques MEYER, Assistant à la Faculté, qui nous a guidé dans nos recherches avec la plus grande amabilité et dont les conseils avisés nous furent d'une aide particulièrement précieuse.

HISTORIQUE

Chapitre Premier

Affinités des *Actinomyces* dans la classification microbienne.

Recherches antérieures sur l'ultrafiltrabilité.

Notre travail a été effectué au moyen de différentes souches d'*Actinomyces*, que nous avons pu isoler nous-mêmes, en collaboration avec Jacques Meyer, sur des malades.

Nous tenons tout d'abord à donner ici un court résumé de la classification de ces organismes et à marquer leur place dans la parasitologie végétale.

Langeron (1) adopte la classification de Foulerton (2), modifiée par Chalmers et Christopherson (3) en 1916 et range ces parasites dans les Microsiphonés. Ces organismes ont un mycélium continu, de calibre très fin, ne dépassant jamais 1 μ de diamètre.

Langeron distingue deux genres :

A) Les *Actinomyces* (Harz 1877) qui sont des anaérobies facultatifs. Le thalle est constitué par des filaments unicellulaires plus ou moins longs, ramifiés, de dimensions variant entre les extrêmes limites de 0,3 μ à 1,2 μ. Ces filaments sont facilement colorables par les couleurs d'aniline et ils sont *Gram* positifs. Le genre *Actinomyces* est caractérisé par la formation typique de spores..

B) Les *Actinobacillus* (Brumpt 1919) (4) présentent un phénomène de scissiparité très accusé, qui rappelle morphologiquement l'aspect de *Streptobacillus*. Ils sont *Gram* négatifs et non acido-résistants.

Les *Actinomyces* se divisent en deux sous-genres :

a) Les *Euactinomyces* avec la Section des *Parasitici*.

b) Les *Cohnistreptothrix*.

La Section des *Parasitici* a été subdivisée en trois sous-sections :

1° Sous-section des *Majores :* Elle comprend les *Actinomyces* faciles à cultiver, produisant sur les milieux solides une efflorescence blanche, crétacée. Les filaments sont nettement ramifiés, plus volumineux que dans les deux autres groupes, en général non acido-résistants. Les cultures répandent souvent une odeur de moisi. Cultures faciles sur pomme de terre, ainsi que sur gélatine et sur sérum coagulé qui sont tous deux liquéfiés. Il y a sécrétion de diastases qui digèrent l'amidon.

2° Sous-section des *Minores :* Ce sont des *Actinomyces* assez faciles à cultiver; les cultures sur milieux solides présentent l'aspect des cultures du *bacille tuberculeux ;* elles sont ternes, poudreuses à la fin, généralement sans odeur. Les filaments, presque toujours acido-résistants, sont rarement ramifiés. Ils ne liquéfient pas la gélatine et le sérum coagulé ou seulement un des deux; ils végètent pauvrement sur pomme de terre et ne produisent pas de diastases. De tous les *Actinomyces*, ces espèces sont les plus pathogènes et produisent habituellement des lésions généralisées.

3° Sous-section des *Breviores : Actinomyces* difficiles à cultiver. Le milieu le plus favorable est le bouillon peptoné, dans lequel ils forment de petites colonies isolées, collées au fond ou aux parois du tube. Sur milieux solides, les cultures ne sont pas efflorescentes; elles sont généralement sans odeur. Les filaments non ramifiés sont réduits à de courts articles bacilliformes. Ils ne liquéfient ni la gélatine, ni le sérum, ne produisent pas de diastases, ne végètent pas sur pomme de terre.

Des recherches morphologiques très minutieuses, effectuées dans ces dernières années ont permis de faire un peu

de lumière sur l'affinité des *Actinomyces*. Les intéressants travaux de NEUKIRCH (5), de MIESCHER (6) et plus récemment d'ANTONIOLI (7) ont démontré l'exactitude des vues de LEHMANN et NEUMANN (8) qui avaient déjà en 1896 créé une famille d'« *Hyphomycètes inférieurs* », comprenant les bacilles de la *morve*, de la *diphterie*, de la *tuberculose*, de la *lèpre* et les microorganismes de l'*actinomycose*. Plus tard, LACHNER-SANDOVAL (9) ont désigné le même groupe d'organismes sous le terme d'*Actinomycètes*.

Paul DUCROUX (10) dans son travail sur les *Mycoses osseuses* a adopté aussi cette dénomination et il divise les *Actinomycètes* en :

a) Corynebactérium. LEHMANN et NEUMANN.

Corynebact. malléi (LEHMANN et NEUMANN).
— pseudodiphtériticum (HOFMANN).
— diphtériae (LÖFFLER).
— xerosis (NEISSER).
— nécrophorum (FLÜGGE).
— fusiforme (VINCENT).

b) Mycobacterium. LEHMANN et NEUMANN.

Mycobact. tuberculosis (KOCH).
— leprae (HANSEN).
— smegmatis (WEBER).
— lacticola (LEHMANN et NEUMANN).
— phleï (MOELLER).

c) Microsiphonés.

Actinomyces HARZ.
Actinobacillus BRUMPT.

La parenté proche de ces 3 familles microbiennes a été en effet démontrée par les travaux de ces différents auteurs.

Par suite de l'importance de ces faits, en ce qui concerne notre travail, nous tenons à citer ici les observations essentielles faites sur la morphologie et l'évolution des *Actinomyces*, telles que ces auteurs les décrivent.

La cellule actinomycétique est limitée par une simple membrane; elle est très allongée et forme un siphon, caractéristique des filaments végétatifs, toujours dépourvus de cloisons transversales.

Lieske (11) insiste le premier sur l'homogénéité du cytoplasme et ses constatations sont approuvées par Antonioli, qui n'a pas pu observer l'existence d'une zone extérieure (Aussenplasma) et d'une zone intérieure (Innenplasma), décrites par Neukirch.

Cet auteur a, pour la première fois, examiné la constitution intracellulaire des *Actinomyces*. Il a pu mettre en évidence dans le protoplasma des grains, isolés les uns des autres à des distances variées. Ceux-ci ne se trouvent pas sur le même plan dans les filaments épais, car ils sont répartis sur la périphérie, mais toujours à l'intérieur du plasma. Par plasmolyse, on peut suivre leur déplacement en rapport avec celui-ci. Ces grains se colorent facilement par des colorants les plus divers, sauf par le Soudan III. Ils existent dans tous les filaments et aussi dans les *oïdiospores*. Dans les *arthrospores*, ils sont réduits à une taille très petite. Après la germinaison des spores, on retrouve ces éléments infiniment petits. Le nombre des grains augmente seulement dans les filaments en croissance.

Dans les parties un peu éloignées de l'extrémité antérieure du filament, ils ne se multiplient plus; leur nombre est toujours constant; leur position reste invariable. Les grains ne peuvent donc pas être considérés comme des produits de dégénérescence. Neukirch a suivi la division d'un grain. A ce moment le grain augmente un peu et s'allonge : une demi-heure après, ou un peu plus tard, on trouve à la même place deux grains assez rapprochés qui se séparent ensuite de plus en plus..... Il y a, en outre, un rapport entre la position du grain et l'accroissement des filaments. Près de l'extrémité du filament, on trouve toujours un grain, de même à l'endroit où une ramification du siphon doit se produire.

M. Antonioli a étudié de très près tous ces phénomènes, soit en goutte pendante, soit en cultures en boîte de Borrel, soit sur des frottis fixés.

En microculture, il a tout d'abord effectué ses ensemencements, en partant des cultures provenant du milieu de Sabouraud glucosé gélosé, sur bouillon ou eau peptonée à 2 %, sur sérum physiologique à 7,5 ‰ et 9 ‰, sur solution de carbonate de soude à 3 % et 5 %. En se servant de ces microcultures, il a alors, au moment voulu pour l'examen

microscopique, effectué des frottis. Ces préparations ont été fixées soit par la chaleur, soit par l'alcool à 96°.

En partant d'une culture sur milieu de Sabouraud glucosé gélosé, il a ensemencé successivement différentes gouttes de sérum physiologique, en flambant après chaque ensemencement le fil de platine et en le rechargeant chaque fois par contact avec la dernière goutte de sérum ensemencé. Il a obtenu ainsi pour la 4e goutte une microculture très diluée et ne contenant que très peu d'éléments mycosiques. Les formes initiales sont constituées essentiellement par des filaments courts, peu ramifiés, plus ou moins bacilliformes. Ces éléments restent sans modification appréciable pendant un examen de 2 heures environ. Au bout de ce temps, il ajoute une nouvelle goutte de sérum physiologique stérile à 7,5 °/oo, afin d'éviter une évaporation de la microculture. L'effet de cette addition de liquide sur les éléments mycosiques peut alors être suivi. Pendant les 15 premières minutes, il a pu assister à l'accroissement des filaments, mais celui-ci se caractérise bien moins par un allongement que par l'apparition d'une ramification. On note, par la coloration modifiée de SCHUMACHER, tout d'abord une légère hypertrophie de l'extrémité d'un filament. Le corpuscule nucléaire, situé dans cette extrémité, augmente de volume. Il se forme une petite hernie sur le filament. Le corpuscule se divise en deux et à ce moment les deux branches du filament subissent un accroissement très accentué. A l'extrémité de chaque nouveau rameau se trouve un corpuscule. Mais le même phénomène nucléaire peut aussi se produire sur une partie plus centrale du siphon. Une portion de corpuscule reste alors dans le filament mère, l'autre émigre dans le nouveau rameau secondaire qui se place à peu près à angle droit par rapport au filament primaire et qui subit un allongement presque instantané. De ce fait, l'auteur a conclu que cette ramification peut être aussi bien monopodiale que dichotomique typique, toutes les deux intimement liées à la division préalable d'un corpuscule nucléaire. Ces ramifications et l'accroissement du thalle mycélien se suivent alors avec une grande intensité. A l'intérieur des siphons mêmes, le morcellement des corpuscules nucléaires continue, sans qu'il soit nécessaire que se produise, pour chaque division corpusculaire, une ramification secon-

daire. D'autre part, le cytoplasme se concentre de plus en plus autour des masses nucléaires et bientôt apparaissent des lacunes à l'intérieur du siphon, qu'on observe déjà en culture directe sans coloration. On arrive alors à des formes filamenteuses allongées, ondulées, ou en fouet.

« Les éléments qui sont ainsi dépourvus en partie de leur cytoplasme et qui sont limités uniquement par la membrane du siphon actinomycétique, se disloquent naturellement très facilement par le moindre choc ou le dessèchement et on obtient alors des fragments filamenteux plus ou moins longs, irréguliers, en forme de haltère, de bâtonnets ou de filaments que LACHNER avait confondus avec les vrais arthrospores de SAUVAGEAU et RADAIS (12) et que NEUKIRCH appelle avec raison une « pseudo-fragmentation », se rencontrant surtout dans les vieilles cultures.

« Ce sont plutôt des phénomènes de dégénérescence que des phénomènes reproducteurs. En effet, si on réensemence sur milieu de SABOURAUD ces stades évolutifs, la culture reste stérile.

« Si, par contre, par addition successive de 2 heures en 2 heures de sérum physiologique ou de solution de carbonate de soude aux microcultures, on évite d'un côté la dessiccation de celles-ci et de l'autre on augmente, à la suite de l'évaporation continuelle, la concentration du milieu de culture, le phénomène d'accroissement du thalle et le morcellement nucléaire continuent invariablement et on obtient un mycélium ramifié, atrophique, hypertrophié, vésiculeux avec des corpuscules nucléaires innombrables de tailles très variables.

« En observant de plus près ces phénomènes, on se rend facilement compte que les corpuscules nucléaires en se divisant, deviennent de plus en plus petits, de sorte qu'ils arrivent à la limite de la visibilité, même en examinant avec l'objectif à l'immersion au 1/18 et avec l'oculaire 9 de compensation. Ils acquièrent ici une sorte d'attraction sexuée. Celle-ci devient même si prononcée, que souvent les corpuscules échappent complètement de leur enclave protoplasmique et à l'aide d'un petit pédoncule protoplasmique émigrent dans la direction d'un corpuscule issu d'un autre fragment filamenteux.

« Ce phénomène de copulation devient encore plus net dans les microcultures âgées de 8 à 16 heures et colorées ensuite par notre méthode de SCHUMACHER.

« On ne peut effectivement pas s'expliquer autrement des formes de cette configuration, que par une attraction sexuée résultant de la juxtaposition de 2 cenogametocytes issus de filaments biodynamiques.

« On peut facilement vérifier que ce phénomène résulte d'un facteur évolutif en ajoutant à la microculture de l'eau distillée, à la place de solutions aqueuses salines à différentes concentrations. Dans ces conditions, le pouvoir dynamogénétique des corpuscules nucléaires reste invariablement identique et nous ne constatons jamais l'apparition de la fragmentation nucléaire suivie d'une attraction sexuée.

« Le phénomène sexué devient par la suite encore plus apparent. On note l'apparition d'une forme très caractéristique : la forme en T. Dans nos cultures, nous avons toujours pu observer, dans certaines conditions, l'apparition de deux sortes d'éléments de forme très remarquable. La forme en T et la forme en Y (double Y). Cette dernière a déjà été observée et décrite par LIESKE sous le terme de « Vierhyphenspore ».

« On voit tout d'abord un filament donnant naissance à une ou deux ramifications monopodiales, mais ces rameaux secondaires, au lieu de subir un allongement subit, n'évoluent guère ; on assiste à une concentration très marquée du cytoplasme tout entier contenu dans le siphon vers les extrémités. Les corpuscules nucléaires subissent dans chaque rameau une sorte de morcellement ou de division, de façon qu'il est possible de compter dans chaque branche 4 ou 8 corpuscules. Souvent, on voit ensuite une ou deux branches se vider complètement, tandis que les portions renfermant le protoplasme condensé s'hypertrophient et, à ce moment, les corpuscules nucléaires issus de différents rameaux, toujours sous l'influence du pouvoir dynamogénétique accru, semblent se fusionner deux par deux en s'attirant réciproquement. Finalement, il résulte une grande cellule en forme de bâtonnet très gros à pôles arrondis, fortement chromophile, renfermant 2 grands corpuscules nucléaires entourés chacun d'une forte

calotte de protoplasme. Ces cellules sont munies d'une membrane double et c'est peut être ces éléments qui ont incité NEUKIRCH à parler de la présence d'une membrane se composant d'un ectoplasme et d'un endoplasme.

« Nous avons donc affaire à une cellule à membrane double, à un protoplasme fortement condensé, à 2 corpuscules nucléaires situés vers les deux pôles de la cellule, sans vacuole, ni produits de déchets. Ces éléments peuvent rester pendant un temps très long dans le milieu de sérum physiologique concentré ou dans la solution de carbonate de soude à 5 %, sans subir la moindre modification. Mais, si on dilue le milieu, ou si on porte stérilement ces cellules sur milieu de SABOURAUD solide ou liquide, elles commencent à germer. Les 2 corpuscules nucléaires se fusionnent tout d'abord pour se diviser immédiatement après. (Processus observé sous le microscope dans une période de 3 à 5 minutes). La cellule s'allonge alors subitement par une extrémité et, à ce stade, les corpuscules nucléaires disparaissent et on n'observe qu'une cellule renfermant un grand nombre de toutes petites granulations, impossible à distinguer sans diaphragmer très fortement et sans faire varier la position du miroir du microscope. Finalement, on obtient un siphon qui ne tarde pas à se ramifier. On assiste à la formation des arthrospores typiques, tels que leur origine a été décrite en tout détail par NEUKIRCH et LIESKE. Ces arthrospores naissent sur n'importe quel endroit du siphon, soit aux extrémités des différents rameaux, soit directement latéralement sur les parois du siphon par la formation de petits bourgeonnements. »

ANTONIOLI n'insiste pas sur l'interprétation de ces phénomènes. Pour lui, l'identification, par la triple coloration différentielle de SCHUMACHER, de ces corpuscules comme substances chromatiques ne laisse aucun doute. Il conclut : « Nous n'avons nulle part pu constater l'existence d'un réseau de chromosomes, nous avons cependant la certitude, vu les divisions et fusions successives et la caractérisation par les colorations spécifiques, qu'il s'agit de corpuscules chromatiques nucléaires ou de rudiments de noyaux cellulaires, capables de se diviser en deux parties égales, de s'unir dans des conditions spéciales rappelant un acte de copulation et doués en sorte d'une valeur dynamique variable suivant

les conditions vitales (Dynamogénie isoforme ou Dynamogénie autogénétique) ».

Nous avons tenu à reproduire textuellement ces observations, car elles sont incontestablement la preuve d'une évolution régulière et progressive dans l'ontogénie des *Actinomyces* et il ne semble pas douteux que ces différents stades constituent l'ensemble ou des phases partielles d'un cycle évolutif des *Actinomyces*.

Mais loin d'isoler par ces phénomènes le groupe des *Microsiphonés* des deux autres familles des *Actinomycètes*, nous constatons, au contraire, leur grande analogie avec les familles des *Corynebacterium* et des *Mycobacterium*.

Si nous suivons les plus récentes recherches bactériologiques, nous voyons qu'en effet la morphologie comparative a conduit à une classification phylogénétique très logique, qui aidera incontestablement à faire progresser la bactériologie.

Citons parmi les auteurs qui ont le plus de mérite à avoir fourni des données spéciales sur le cycle évolutif des microbes : Löhnis (13), Beauverie (14), Almquist (15), Enderlein (16), Hoag (17), A. Evans (18).

D'après Löhnis, les bactéries, cellules végétatives, ont des propriétés autolysantes à un certain moment de leur évolution; à ce stade leurs protoplasmes se fusionnent en un « *symplasme* », qui peut s'entourer d'une membrane et devenir ainsi un « macrokyste ». Ces éléments donnent, dans des conditions favorables, naissance à des formes de régénération (unité-régénérative). Ces jeunes cellules végétatives entrent en conjonction pour engendrer des gonidanges, renfermant des gonidies. Celles-ci donnent naissance à d'autres formes végétatives, parfois ramifiées, cellules-mères des « arthro-endo et exospores ». L'auteur mentionne en outre une formation spéciale, les *Regenerativ-Körper*, capables de se diviser par scissiparité transversale ou de s'enkyster et de devenir des microkystes. Ces différents éléments donneront ensuite des formes végétatives normales qui s'autolysent de nouveau pour reformer des symplasmes.

Beauverie a pu contrôler l'exactitude de ces observations sur l'*Azotobacter chroococcum*, mais il n'admet pas la formation des *symplasmes*.

Almquist a étudié le cycle évolutif du *Bacterium typhosum* Gaffky et du *Vibrio cholerae* Flügge.

Enderlein confirme les recherches d'Almquist et a pu établir un rythme évolutif des bactéries.

Cet auteur, dans une critique très sévère des bactériologistes d'aujourd'hui, déclare qu'ils sont en bactériologie encore au même point en ce qui concerne la morphologie comparée, qu'était le physiologiste R. Ludwig, il y a 81 ans. Celui-ci voulait démontrer à Leuckart que la morphologie comparée n'avait aucune raison d'être scientifique et n'était qu'un amusement artificiel.

Leuckart dans sa réponse, a donné la définition fondamentale suivante :

La physiologie ne s'occupe que des questions relatives aux besoins et au fonctionnement de l'organisme, tandis que la morphologie comparée démontre la régularité de la constitution, de l'évolution et par conséquent aussi de la classification et de la phylogénie.

L'évolution cyclique signifie en bactériologie une transformation de forme d'une bactérie vers une autre forme, accompagnée d'une modification dans la croissance. Dans cette période, de durée plus ou moins longue, on trouve des aspects variant alternativement vers l'un ou l'autre stade de la bactérie.

L'auteur donne dans sa *cyclogénie des bactéries* une nomenclature nouvelle pour décrire les différents stades de l'évolution des bactéries et nous tenons à donner ici un résumé de cette nouvelle dénomination.

Le noyau bactérien est désigné sous le terme de *Mych* et par conséquent l'unité bactérienne la plus simple sera le *Mychit* qui représente la forme sphérique des coques. Par dédoublement longitudinal du *Mych*, le *mychit* évolue vers la forme la plus simple du bâtonnet (katatakte Stäbchen), le *dimychit* (bâtonnet à 2 *Mychs*). Viennent ensuite, toujours par bipartition successive des *Mychs :* le *didimychit* (bâtonnet à 4 *Mychs*), le *tétradimychit* (bâtonnet à 8 *Mychs*), l'*octodimychit* (bâtonnet à 16 *Mychs*), le *sédecimdimychit* (bâtonnet à 32 *Mychs*).

Les différents stades cycliques des bactéries, qui résultent de l'ensemble de ces observations, sont :

Le Basit : changement de la forme de croissance entre le *mychit* et le *dimychit*, c'est-à-dire transformation évolutive de la forme en coque vers la forme du bâtonnet très court.

Comme exemple, ENDERLEIN cite : *Meningocoque, Bacillus influenzae, Actinomyces radiatus, Bactérium Coli,* etc....

Le Phytit : Changement de la forme de croissance entre le *dimychit* et le *didimychit*, c'est-à-dire transformation évolutive de la forme du bâtonnet très court vers la forme du bâtonnet moyen.

Exemple : *Streptobacillus pyogenes, Bacillus pyocyaneus, Bacillus Malléi, Bacillus Typhi, Bacillus prodigiosus, Pseudomonas gracilis* MIG, etc....

Le Rhabdit : Changement de la forme de croissance entre le *didimychit* et le *tetradimychit*, c'est-à-dire transformation évolutive de la forme en bâtonnet moyen vers la forme bâtonnet long.

Exemple : *Bacillus megatherium, bacillus subtilis, bac. Amylobacter, bac. pyocyaneus, bac. tetani, bac. mesentericus fuscus, bac. Coli,* etc....

Le Linit : Changement de la forme de croissance entre le *tetradimychit* et *l'octodimychit*, c'est-à-dire transformation évolutive de la forme bâtonnet long vers la forme bâtonnet très long.

Exemple : *Bac. mesentericus vulgatus, bac. oedematis maligni, bacillus oxaliticus* ZOPF, *Myxococcus rubescens, bac. subtilis, bac. Actinobacter,* etc....

L'Ascit : Changement de la forme de croissance entre l'*octodimychit* et le *sedecimdimychit*, c'est-à-dire transformation évolutive de la forme bâtonnet très long vers la forme petit filament.

Exemple : *Bacillus sporogenes, Corynebacterium diphteriae* (NOVAK), *bacillus tuberculosus.*

Le Mycascit : Le long filament qui par cloisonnement se transforme en stades inférieurs.

Ceci constitue d'après ENDERLEIN, sommairement résumée, la cyclogénie évolutive des *bactéries*.

Nous tenons encore à donner ici quelques détails des observations de cet auteur sur la morphologie comparée du *bacille tuberculeux*, d'où il nous sera facilement possible de conclure à la proche parenté de cet organisme avec les *Microsiphonés*, décrite d'après ANTONIOLI.

L'auteur a examiné avec des techniques spéciales, décrites avec détail, les stades évolutifs du *bacille de* KOCH, provenant de différentes origines.

Nous ne donnons ici que l'évolution examinée par l'auteur sur un bâtonnet tuberculeux se trouvant dans le stade de *Phytit*, c'est-à-dire un organisme possédant 2 ou 4 noyaux (dimychit et didimychit). Ces bâtonnets possèdent des noyaux hypervalents (« hypervalente Mych ») en état d'inertie (« mochlose »), donc très difficilement muables et peu évolutifs. Cette inertie est rompue (« mochlolyse ») par l'action d'une solution de NaCl à 1/4 %. On assisterait alors à la formation de substances de réserves autour d'éléments nucléaires appelés « *Trophosomes* », qui, eux, forment les *Mychs*. Les Mychs engendrent des traînées filamenteuses avec des particules nucléaires : les *Chondrites*. Ces éléments possèdent une sorte d'attraction sexuelle et peuvent ainsi, en copulant, donner naissance à un nouveau *Mych plurivalent*. Mais, d'autre part, la désagrégation du bâtonnet peut encore continuer plus loin et alors la structure cellulaire réellement délimitée se perd complètement. Le protoplasme se disloque et l'élément amorphe qui en résulte porte le nom de *Symplaste*. Celui-ci possède encore des vestiges nucléaires appelés *Symprotites*. Les symprotites se réunissent par une sorte de copulation et donnent alors les stades *chrondrites*, base du cycle évolutif du *bacille tuberculeux* jusqu'au stade *Ascit*.

Nous avons donc ainsi des stades très évolués, ramifiés qui se rapprochent énormément des formes des *Microsiphonés*, et qui rappellent beaucoup les éléments décrits par ANTONIOLI pour son *Actinomyces Allenbachii*.

D'autre part, le stade évolutif des *Symprotites*, dépourvu de plasma, ou le stade du *Chondrite*, constitué uniquement par des vestiges nucléaires, représenterait la forme ultra-filtrante du *bacille tuberculeux*, dont l'existence a été

démontrée par les recherches de Fontès (19), Gessard (20), Vaudremer (21), Calmette (22), Valtis (23), Ferran (24), etc....

Dans un travail récent, A. Ch. et G. Hollande (25), étudient la cytologie et le cycle évolutif de quelques microbes pathogènes de l'homme et arrivent à des observations, qui ne varient guère avec les constatations précitées.

Nous donnons tout d'abord, pour mieux comprendre la terminologie des auteurs, le résumé de leurs recherches sur le *Bactérium typhosum*, en citant les auteurs :

« En résumé, on peut actuellement considérer 5 ou 6 stades dans le cycle évolutif du *bacille d'*Eberth suivant que l'on confond ou non les « formes évoluées » du bacille avec les « *schizophytoïdes* ». A ces stades viendront s'ajouter ceux de la sexualité, lorsque les gamètes auront été découverts, ceux-ci devant se placer au début du cycle.

Le premier stade du cycle peut être considéré comme étant le « *renitocyte* ». C'est une forme de résistance, non comparable à une spore. Le *renitocyte* est formé par une sphère minuscule; lors de son élaboration, elle est pourvue d'une membrane entourant une zone de protoplasme renfermant un nucléosome et de la métachromatine neutrophile. Les *renitocytes* constituent probablement l'ultra-virus, le *virus filtrant du bacille typhique*.

Le deuxième stade est formé par des éléments microbiens minuscules, nés des renitocytes; courts et fins bâtonnets à protoplasme cyanophile, ils sont pourvus chacun d'un nucléosome imperceptible en l'absence de toute metachromatine.

Ces bacilles se multiplient activement et donnent naissance aux « formes jeunes » du microbe (Stade III).

Ce sont des bacilles à bouts arrondis, sans vacuole apicale, ayant un protoplasme basophile, possédant un noyau médian *(nucléosome)* fréquemment entouré de métachromatine erythrophile; l'ensemble de cette métachromatine forme le « *paranucléosome* ».

Le stade IV est constitué par les « *phytoschizontes.* » Ce sont de longs bacilles multinuclés, à protoplasme basophile possédant une metachromatine érythrophile au début de leur évolution, cyanophile à la fin.

Les *phytoschizontes* peuvent présenter à leurs extrémités quelques membranes transversales, colorées en bleu par les éosinates. Dans le protoplasme des *phytoschizontes* se forment des vacuoles qui limitent et individualisent des îlots d'une métachromatine; chacun de ces îlots donne naissance à un *métachromatinosome* renfermant un nucléosome, souvent divisé.

Le phytoschizonte se transforme ainsi en un chapelet d'individus microbiens, les *schizophytoïdes ;* ceux-ci sont mis en liberté par clivage d'une double cloison intravacuolaire.

Les schizophytoïdes libérés sont absolument semblables aux formes évoluées du *bacille d'*Eberth. Ils constituent le stade V.

Les éléments du stade VI sont formés par les « formes évoluées » du *bacille d'*Eberth. Ce sont les *bacilles typhiques* proprement dits : ils ont un protoplasme basophile, possédant 2 vacuoles apicales et 2 métachromatinosomes ayant chacun un nucléosome.

Les « formes évoluées » et les « *schizophytoïdes* » étant semblables, les stades V et VI devraient être confondus en un seul stade, si ce n'était l'origine différente de ces éléments. Les formes évoluées du *bacille typhique*, de même que les schizophytoïdes peuvent se multiplier par scissiparité transversale.

Ils donnent naissance, dans les cultures âgées, aux formes de résistance, les « *rénitocytes* ».

Ainsi, ayant par cette description du cycle évolutif du *bacille d'*Eberth, essayé de fixer nos idées sur la terminologie de Hollande, nous résumons les observations sur le *bacille de* Koch, que nous allons maintenant plus facilement comprendre :

«Le *bacille de* Koch s'éloigne considérablement, par sa structure cytologique, des autres bacilles observés, *bacilles coli-typhiques*, *bacille dysentérique*, *bacille du charbon*.

«Bien que ses dimensions soient souvent exiguës, il possède néanmoins, comme tous les microbes et toute cellule vivante, un ou plusieurs noyaux *(nucléosomes)*, un protoplasme avec diverses substances de réserve *(paranucléosomes* et *métachromatinosomes)* et une simple membrane.

« Le *bacille de* Koch acido-résistant, pourvu de ses corpuscules de Much, que l'on rencontre dans les lésions pulmonaires est la « *forme durable* » du parasite de la tuberculose. A ce stade, le bacille est en général dépourvu de protoplasme; il est alors constitué uniquement par une cellule morte, possédant des membranes plus ou moins acido-résistantes; à l'intérieur du corps microbien, se voient des corpuscules acido-résistants : les *rénitocytes*, qui dérivent des corpuscules de Much, primitivement cyanophiles.

« Lors de sa formation, le *rénitocyte* comprend un nucléosome entouré d'une petite zone de protoplasme, qu'imprègne fortement une métachromatine cyanophile. Une membrane isole le tout du milieu extérieur. Le *renitocyte* formé est constitué par une sphère souvent minuscule, apte à traverser les bougies de porcelaine. Il devient ainsi l'ultra-virus ou *virus filtrant du bacille tuberculeux*.

« A partir des *renitocytes*, naissent des germes corpusculaires qui, en grandissant, prennent la forme de bacilles à protoplasme dense et basophile, pourvu de nucléosomes et de métachromatine.

« Le bacille à ce stade, souvent très faiblement ou pas du tout acido-résistant, se multiplie alors par divisions transversales.

« Aux dépens des formes végétatives qui prennent ainsi naissance et chez lesquelles s'élaborent des métachromatinosomes, se produiront ultérieurement les *bacilles de* Koch proprement dits, acido-résistants, dépourvus généralement de protoplasme, mais possédant des *rénitocytes*.

« Dans certaines conditions défavorables du milieu, les formes végétatives du *bacille tuberculeux* se transforment en « éléments coccoïdes », ceux-ci deviennent l'origine des « formes ramifiées » de *Mycobacterium tuberculosis*.

« Les formes ramifiées sont constituées par de nombreux filaments de grosseurs diverses; ceux-ci sont parfois très allongés et cloisonnés; d'autre fois, ils sont pédiculés à leur base et renflés en massue à leur sommet. Les filaments cloisonnés sont aptes, dans certains cas, à donner naissance à de très petits éléments microbiens, qui, ultérieurement, se transforment en *bacilles de* Koch; les filaments en forme

de massues constituent des appareils sexués; ce sont des *gamontes*.

« La conjugaison a lieu par accollement de 2 massues; l'une de ces massues possède une membrane erythrophile, l'autre massue possède au contraire une membrane cyanophile. Chaque massue renferme à sa partie supérieure un nucléosome situé au centre d'une zone protoplasmique différenciée (gamète). Les nucléosomes des gamontes se fusionnent, puis s'élabore, au sein du gamonte érythrophile un gros et unique granulé que nous considérons comme devant être « *l'œuf* » de *Mycobactérium tuberculosis*.

« De cet œuf sortira un mince et court filament microbien, qui, en se multipliant, reproduira les formes propres au bacille tuberculeux. Avant d'aboutir à la « forme durable » qu'est le « *Bacille de* Koch », le germe issu de l'œuf (?) donnera naissance à un stade microbien, riche en protoplasme, dépourvu de rénitocytes, se divisant activement par scissiparité transversale.

« Les structures cytologiques diverses que nous avons mises en évidence chez le *mycobactérium tuberculosis*, de même que le cycle évolutif que nous avons pu en tracer, confirment les données de Roman (26). Le *bacille tuberculeux* est plus proche parent des *Champignons* que des *Bactéries* (sensu stricto); c'est avec juste raison qu'on le range parmi les « *Actinomycétées* ».

Nous avons ainsi reproduit les conclusions de A. Ch. et G. Hollande. Nous en retenons en premier lieu, que ces auteurs arrivent aux mêmes raisonnements que les savants précités : Le *bacille de* Koch est un stade du cycle évolutif d'un organisme qui est proche parent des *Microsiphonées*. Il passe par un autre stade, où il est capable de traverser l'*ultrafiltre*. Il doit exister une attraction sexuée avec un phénomène de copulation.

Comparant les faits mentionnés par ces auteurs avec ceux décrits par Enderlein, nous croyons pouvoir synchroniser les stades suivants, malgré que M. et Mme Hollande insistent, qu'il leur n'a pas été donné, lors de leurs études, d'observer dans le cycle évolutif des divers microbes étudiés, la formation du « *Symplasme* » de Lœhnis.

Le stade renitocyte doit correspondre au stade chondrite, les éléments coccoïdes représentent le basite d'Enderlein, les formes jeunes sont encore du stade basite ou phytite. La vraie forme du bacile de Koch proprement dite est le *schizophytoïde* d'Hollande «forme durable» et le *phytite* ou le *rhabdite* d'Enderlein.

Le seul point où nous trouvons un désaccord dans les observations de ces auteurs, est la phase sexuée.

Enderlein attribue au stade *chondrite* et *symprotite* des propriétés sexuées, tandis que les savants français observent que l'élément coccoïde donne naissance à des formes ramifiées. Dans certaines conditions, des éléments en massues font leur apparition, ce sont des gamontes qui représentent l'appareil sexué, doués d'une attraction copulative, d'où naîtra un œuf.

Mais, quoi qu'il en soit dans les deux cas, l'élément filtrable a été démontré, ainsi que la parenté avec les *Actinomyces*.

Si on a le droit de ranger le *bacille de* Koch et les *Actinomyces* dans un même groupe phylogénétique, il nous semble que l'étude morphologique des *Actinomyces* est beaucoup plus facile à suivre; en effet, leur moindre virulence et leur plus grande taille, permet d'éclaircir plus facilement cette question de la reproduction sexuée, point de discordance entre A. Lœhnis et Enderlein d'un côté, et A. Ch. et Mme G. Hollande de l'autre.

Nous avons ci-dessus donné la description détaillée des observations d'Antonioli sur l'évolution des *Actinomyces*. Cet auteur a pu, en effet, constater à la suite d'une augmentation de la concentration du milieu de culture, une fragmentation très intense des éléments nuclés et ces grains à la limite de la visibilité acquièrent une sorte d'attraction sexuée très prononcée. Ce stade suivi et décrit très minutieusement par Antonioli, est sûrement comparable avec celui que Lœhnis et Enderlein désignent sous le terme de *symprotite* et *chondrite*.

D'autre part, les phénomènes reproducteurs qu'Antonioli décrit sous le terme de *Vierhyphenspore*, en forme de T ou de Y, représentent la genèse d'un œuf et peuvent être

comparés au phénomène copulateur au moyen de deux gamètes observés par HOLLANDE.

Nous croyons donc que, par l'étude du cycle évolutif des *Actinomyces*, il est possible de suivre plus facilement les différentes formes de la reproduction sexuée de ces micro-organismes et il doit exister deux phases où le phénomène sexué fait son apparition : une première fois au moment de la dynamogénie hypervalente et, une autre fois, au moment d'une perturbation extrême au cours de la multiplication végétative.

Ces phénomènes qui ont été vus par ANTONIOLI chez les *Actinomyces*, doivent donc aussi exister chez le *bacille de* KOCH et les faits observés par les différents auteurs précités, doivent se compléter réciproquement pour faire partie du cycle évolutif complet du *Mycobactérium tuberculosis*.

Ce fait se trouve confirmé par les travaux de LUCKSCH ; cet auteur a constaté qu'il existe deux sortes de grains dans les différents prélèvements et culture du *bacille de* KOCH. Les deux formes prennent la coloration de GRAM.

« Les nombreux petits grains sont répartis par 4, 6, ou plus encore, sur le *bâtonnet tuberculeux ;* ils sont l'expression d'une réaction contre l'influence de conditions externes défavorables et semblent en relation étroite avec la formation de *symplasmes*. D'autre part, LUCKSCH décrit une seconde sorte de grains qui se différencient des premiers par leur taille plus grande, ovalaire et leur position le plus souvent apiculaire et au nombre de un seulement sur le bâtonnet. Ces éléments sont capables de germer immédiatement et acquièrent la forme *clostridium*. Les grands éléments ovalaires ressemblent à des spores et peuvent être envisagés comme un acte réalisé par la substance vivante bactérienne, pour combattre des conditions défavorables externes par une concentration protoplasmique *sporulaire !* »

Ces deux sortes d'éléments décrits par LUCKSCH confirment encore notre manière de voir et prouvent qu'il doit exister chez le *bacille de* KOCH deux sortes de corpuscules nucléaires résultant d'un phénomène sexué : les petits grains analogues au stade de *chondrite* d'ENDERLEIN et les grands grains sporulaires représentant l'*œuf* proprement dit de HOLLANDE.

Si ainsi morphologiquement le cycle évolutif du *Mycobactérium tuberculosis* et des *Microsiphonées* semble être analogue, il reste cependant physiologiquement un fait à prouver.

Nous savons aujourd'hui, par les travaux de Fontès, Vaudremer, Calmette et Valtis, Rabinowitsch (26) et d'autres, qu'il existe une forme ultra-filtrable du *bacille tuberculeux*, capable de produire un état patologique très typique et étudié par Calmette en France, par Fraenkel et Much (28) en Allemagne.

Si le cycle évolutif des deux groupes des *Actinomycétées* est identique, ces éléments ultrafiltrables doivent être plus facilement encore caractérisables chez les *Microsiphonées* que chez le *bacille de* Koch. C'est Lucksch qui avait émis le premier cette idée. Dans un remarquable travail, il a pu démontrer que des jeunes cultures d'*Actinomyces Bovis* sur milieu maltosé liquide, produisaient des éléments granuleux capables de traverser l'ultramembrane de la bougie de Berkefeld et de Chamberland.

Ces grains filtrables sont démontrables microscopiquement dans l'ultrafiltrat et se développent sur un nouveau milieu, suivant la période de réensemencement sous des aspects variés.

L'auteur distingue ainsi une forme ressemblant à des colonies de *Staphylocoques* géants évoluant vers la forme *pseudo-diphtérique* et une autre forme rappelant des colonies de *Streptocoques* avec des éléments bourgeonnant et des formes en bâtonnets ramifiés.

L'auteur a ainsi pu démontrer morphologiquement et par la culture que l'*Actinomyces Bovis* était capable d'engendrer des éléments ultrafiltrables analogues aux grains du *virus tuberculeux*. Ces formes filtrantes font partie du cycle évolutif des *Actinomyces*, qui comprend des stades en forme *Staphylocoques* ou *Streptocoques*, de *Corynébactérium pseudodiphtériae* et qui évoluent en culture sur milieux convenables vers les *stades filamenteux typiques*.

Nous aurons l'occasion au cours de nos travaux person-

nels de revenir sur ces constations de LUCKSCH et de les confirmer point par point.

Ces faits sont si facilement contrôlables et l'aspect morphologique des différents stades évolutifs des *Actinomyces* est tellement caractéristique, qu'on ne peut que s'étonner de leur découverte tardive et de la confusion regrettable que subissent encore aujourd'hui dans la bactériologie courante, ces éléments actinomycétiques avec les *bacilles cocciformes* ou les *corynebactériums*.

CHAPITRE II

Recherches antérieures sur l'emploi et la technique de fabrication des ultrafiltres de collodion.

SANARELLI (29) a été le premier à employer en bactériologie des sacs de collodion pour l'étude in vivo de l'inhibition du *charbon*. Il introduisait sous la peau des animaux des petits tuyaux de collodion hermétiquement fermés, qui se remplissaient en peu de temps d'une lymphe limpide, dépourvue complètement de leucocytes. L'auteur publia sa découverte en 1893 en France (30) et bientôt on utilisait sa technique à l'Institut PASTEUR. En effet, METCHNIKOFF, ROUX et TAURELLI-SALIMBENI (31) emploient la même méthode pour l'étude des toxines des vibrions cholériques en implantant dans le péritoine des cobayes des sacs de collodion renfermant un bouillon peptoné chargé préalablement d'une faible dose de vibrion cholérique. De nombreux travaux sur l'ultrafiltration au moyen du sac de collodion se suivent alors en France, dont nous tenons à ne citer ici que ceux de NOCARD (32), ROUX, BORREL, SALIMBENI et DUJARDIN-BEAUMETZ, MALFITANO (35), MANEA (36), NICOLAU (37), HAUDUROY (38) et d'autres. Nous tenons surtout à rappeler encore les auteurs cités dans le premier chapitre de notre travail, tels que CALMETTE, FONTÈS, VAUDREMER.

Nous empruntons au remarquable travail de Mlle M.-A. BEAUVERIE (33) les idées suivantes sur les ultravirus et l'ultrafiltration.

« Les ultravirus possèdent les propriétés générales des colloïdes. Or, les bougies poreuses ne peuvent être employées pour la filtration des colloïdes, en général, à cause de l'absorption. Suivant les variations des conditions de réaction chimique ou électrique du milieu, qui régissent cette absorption, le virus passera ou sera retenu; cette propriété absorbante des filtres vis-à-vis des bactéries a provoqué de nombreuses discussions à propos de la filtrabilité des agents de nombreuses maladies à ultravirus. Lors même que le passage se produisait, on pouvait toujours dire que c'était à cause d'un défaut de l'appareil filtrant. Si, au lieu d'un filtre, on emploie un ultrafiltre, l'expérience de filtration réussit sans exception. Les pores de l'ultrafiltre ont pourtant un diamètre beaucoup plus faible que celui des pores des bougies; mais, par contre, l'absorption y est minima, la matière filtrante étant ici non plus formée de matières minérales ionisables, mais de collodion, *non* ionisable. »

Duclaux et Errera (34) définissent ainsi *l'ultrafiltration :* « Elle consiste à faire passer un liquide au travers d'une membrane telle que les substances dissoutes à l'état colloïdal soient retenues, alors que celles dissoutes à l'état moléculaire puissent passer. »

Mode de préparation des filtres en collodion

Quant à la préparation des sacs de collodion, des procédés très différents ont été décrits. Nous mentionnons le classique procédé externe, avec renflement olivaire du tube moule, décrit avec détail tout récemment par Sigaud (39), élève de Malfitano. Cet auteur formule trois conditions indispensables pour la préparation d'ultrafiltres en collodion :

1° La matière de la paroi filtrante doit être quasi-insoluble et ne doit céder presque rien qui puisse altérer la composition chimique du liquide traité.

2° L'hémiperméabilité, c'est-à-dire la perméabilité vis-à-vis des matières finement dissoutes et l'imperméabilité vis-à-vis des matières formées de micelles volumineuses ou de granules en suspension, et des microbes qu'on veut séparer, doit être garantie.

3° La forme et l'agencement de la membrane doit être de sorte qu'elles permettent d'obtenir pour un volume donné, le maximum de surface utilisable.

Nous aurons l'occasion ultérieurement, lors de la description de la technique employée par nous au cours de nos recherches, de revenir sur le travail de SIGAUD qui nous a été un guide précieux. La technique de MALFITANO et SIGAUD présente un léger inconvénient ou plutôt une manipulation un peu délicate demandant quelques essais préalables afin d'acquérir une certaine routine, c'est la manœuvre de décolletage entre le mandrin (tube moule) et le sac de collodion.

Pour cette raison, LUMIÈRE et CHEVROTIER (40) ont proposé de remplacer les tubes moules par une pâte plastique (1 partie de sirop de sucre, 2 parties de sucre en poudre dit « sucre glacé ») permettant de modeler des moules de toutes formes. Le sac de collodion étant moulé, on le plonge dans de l'eau, qui par dialyse dissout la masse sucrée et libère le sac. CALMETTE (41) vient de publier un autre procédé. Il utilise des tubes moules perforés à leur extrémité arrondie. Il plonge la face externe des tubes dans de la gélatine, la laisse sécher, la déshydrate dans l'alcool absolu (c'est le point délicat, voir LE GUYON) et il plonge les moules dans du collodion. Le démoulage se fait dans de l'eau chaude à 80°, qui fait entrer en fusion la couche de gélatine séparant le collodion du verre. « Le sac, dit CALMETTE, tombe d'une seule pièce, sans un pli, sans une déchirure, parfaitement lisse et transparent. »

Dans tous ces procédés, le tube moule donnant au sac de collodion sa forme; se trouve à l'intérieur et le collodion l'entoure extérieurement. LE GUYON (42) emploie par contre une technique inverse. Nous citons verbalement l'auteur : « Nous versons successivement le collodion d'un tube dans un autre en faisant tourner en sens inverse les tubes l'un sur l'autre, bout à bout, jusqu'à égouttage complet. Les tubes sont mis ensuite à sécher pendant 15 minutes en position renversée sur un portoir, puis roulés sur la table pendant 2 minutes et placés ensuite sur un portoir en position droite pendant 30 minutes. Les tubes sont alors plongés dans de l'eau ayant été portée à l'ébullition et ramenée à 80°. Les

sacs sortent d'eux-mêmes de l'intérieur du tube moule, ou sont sortis par traction légère en introduisant le petit doigt sur le bord interne du tube moule. Les sacs sont ensuite moulés sur des tubes supports. »

On peut faire à volonté des séries de sacs plus ou moins perméables en faisant varier les proportions d'alcool et d'éther servant à préparer le collodion.

Les filtres de collodion présentent une grande gamme de perméabilité en rapport avec différents facteurs :

1° L'épaisseur de la membrane de collodion, résultant du mode et du temps d'imbibition du mandrin dans le collodion.

2° Le degré d'humidité de l'atmosphère dans laquelle se fait la dessiccation des sacs de collodion.

Ainsi, ZSIGMONDY et BACHMANN (43) ont établi qu'à :

Une tension des vapeurs d'eau en mm de Hg de:	correspond une durée de filtration sous pression de 100 cm d'H^0 de
16,4	50 secondes
13,0	90 secondes
10,9	15 secondes
7,4	très vite.

3° La nature des solvants employés et la proportion des différents composants entrant dans le mélange solvant.

Ordinairement, on dissout le coton nitré dans un mélange d'alcool et d'éther sulfurique.

Nous citons les faits établis par J. DUCLAUX pour les 2 mélanges suivants (DUCLAUX et ERRERA (44).

I.	Alcool à 96°	500 cc	Perméabilité forte.
	Ether à 65°	500 cc	
	Coton nitré	20 grs	
II.	Alcool à 96°	250 cc	Perméabilité faible.
	Ether à 65°	750 cc	
	Coton nitré	50 grs	

Ainsi on constate que l'addition d'alcool augmente la perméabilité; il y a encore d'autres tours de main permet-

tant d'arriver au même résultat; ainsi de faibles portions de glycérine ou d'huile de ricin, ajoutées au mélange alcool-éther, réalisent le même phénomène. C'est Schoep (45) qui a étudié pour la première fois l'effet des adjuvants.

4° La dessiccation diminue la perméabilité des filtres en collodion; plus la dessiccation augmente, plus l'imperméabilité devient rigoureuse.

5° L'âge de la solution du collodion joue aussi, d'après les expériences de Bechold (46), un rôle important. Ainsi pour la même quantité de liquide, le temps de filtration varie dans les proportions suivantes.

Age d'une solution à 7.5% de collodion et à 10% d'acide acétique:	Temps de filtration
0 jour	13'15"
1 »	13'30"
3 »	13'10"
5 »	13'25"
8 »	13'30"
18 »	11'25"
30 »	9'50"
46 »	7'10"
71 »	6'30"
83 »	4'52"

Brown (47), Eggerth (48), Northrop (49), ont étudié très rigoureusement tous ces facteurs intervenant dans la perméabilité des membranes de collodion.

Ajoutons encore que la résistance des filtres en collodion dépend de leur concentration en coton nitré et que la perméabilité des membranes peut être sauvegardée en les immergeant dans une solution aqueuse faible de glycérine neutre.

Avant de terminer ce chapitre de notre historique, nous voudrions donner quelques détails sur la constitution chimique de la Cellulose, de la Cellulose nitrée et des différents procédés de fabrication.

La composition de la Cellulose répond à la formule $(C^6\ H^{10}\ O^5)$ n. Elle résulte d'une concentration moléculaire de glucose avec mise en liberté de molécules d'eau.

Sur 6 atomes de C il reste dans chaque molécule de cellulose 3 groupes d'oxhydryle libres, qui sont aptes aux réactions chimiques, par exemple : pour la formation d'éthers. La formule plus exactement est donc : $(C^6\ H^7\ O\ (OH)^3)\ n$.

La cellulose est insoluble dans les solvants habituels. Par l'action de l'H^2SO^4, suivant la concentration de l'acide et le temps d'action, la cellulose subit des modifications. Ainsi, l'acide sulfurique à 62,5 % la transforme en cellulose colloïdale et l'H^2SO^4 à 78 % donne du parchemin. L'acide sulfurique plus concentré encore, forme d'abord des éthers sulfuriques, il se produit une hydrolyse par absorption d'eau qui aboutit à la formation d'hydrocellulose et finalement celle-ci se transforme en glucose.

On désigne sous le terme *cellulose nitrée* ou *coton nitré* des éthers azotiques de la cellulose, obtenus par l'action de l'acide azotique concentré sur la cellulose. Mais ce ne sont pas des composés azotiques véritables (Troost (50). La constitution des celluloses nitriques est différente de celle des composés nitrés comme le nitro-benzène. En effet, sous l'influence des réducteurs, on obtient une amine : l'azote reste, tandis que les réducteurs, en agissant sur les premiers, donnent lieu à un dégagement d'oxyde azotique et régénèrent la cellulose.

On arrive à la même conclusion quand on compare les quantités de chaleur dégagées dans la formation des celluloses nitriques et dans celle des composés nitrés obtenus par la substitution du peroxyde d'azote à l'hydrogène des carbures d'hydrogène, comme l'on fait Berthelot d'une part, L. Troost et Hautefeuille de l'autre.

« Les celluloses nitriques sont, d'après ces divers résultats, des éthers nitriques de la cellulose jouant le rôle de polyalcools. »

Le coton nitré et le coton-poudre ou *fulmi-coton* se distinguent par le degré de nitrification. Par l'action de HNO^3 sur la cellulose, il se forme toujours des mélanges de différents éthers nitriques. On les appelle Cellulose mono—, di—, tri—, tetra—, penta—, etc... nitrée. Dans ce cas, le mot numérique mono—, di—, etc... signifie les nombres de radicaux nitriques — NO^2 fixés sur un groupe oxhydryle en déplaçant un atome d'H de la molécule de cellulose arbitrairement supposée

de $(C^6 H^{10} O^5)^2$ ou $C^{12} H^{20} O^{10}$. La cellulose tetra-nitrée par exemple répond à la formule $C^{12} H^{16} O^6 (O N O^2) 4$. Mais si on admet pour la cellulose la structure moléculaire de $(C^6 H^{10} O^5) 4 = C^{24} H^{40} O^{20}$, ce qui répond plus à la réalité, il faut naturellement dédoubler le nombre de radicaux nitrés entrés en combinaison. Ainsi la molécule $C^{24} H^{40} O^{20}$ peut fixer de 2 à 12 groupes de $— N O^2$ et la cellulose tetra-nitrée prend alors la structure chimique de : $C^{24} H^{32} O^{12} (O N O^2) 8$.

Les propriétés de la cellulose nitrée se modifient avec le nombre de groupes NO^2 entrés dans la combinaison. Ces modifications s'exercent sur l'effet explosif du fulmicoton, sur la solubilité dans un mélange alcool-éther, sur la solubilité dans des autres solvants et sur la viscosité des solutions de collodion.

La cellulose faiblement nitrée, renfermant 2 à 4 groupes $— NO^2$ sur la molécule $C^{24}H^{40}O^{20}$, est insoluble dans l'alcool-éther; si elle possède 4 à 7 radicaux $— NO^2$ elle devient partiellement soluble; la molécule ayant fixé 7 à 10 radicaux $— NO^2$ devient presque soluble ou entièrement soluble, tandis que les combinaisons avec 11 à 12 radicaux $— NO^2$ deviennent de nouveau difficilement solubles. Les solutions éthero-alcooliques de coton nitré à 7 ou 8 groupes $— NO^2$ sont très fluides, celles de 9 à 10 groupes de NO^2 deviennent gélatineuses. La cellulose nitrée de 7 à 11 radicaux NO^2 est presque soluble ou totalement soluble dans l'acétate d'Amyle et la viscosité des solutions augmente dans ces cas proportionnellement avec le nombre de radicaux NO^2 fixés.

Le pouvoir explosif est le plus prononcé chez les cotons nitrés à plus grand nombre de groupes de NO^2.

Théoriquement, la cellulose nitrée se formerait par l'action de l'acide azotique sur la cellulose; en pratique on emploie cependant toujours des mélanges d'acide azotique et d'acide sulfurique concentrés.

Le degré de nitrification de la cellulose, c'est-à-dire le nombre de groupes $— NO^2$ fixés et la solubilité de la cellulose nitrée dépendent de la composition du mélange des acides.

Pour préparer un coton nitré facilement soluble, il faut tenir compte de la teneur en eau du mélange des acides; ce facteur est de la plus grande importance et la proportion

en H^2O ne doit pas dépasser 19 %; le meilleur coton nitré soluble s'obtient avec des acides renfermant 17 à 18 % d'eau. Si la teneur en eau dépasse ces valeurs, il arrive facilement que la cellulose se dissolve complètement dans le mélange acide, par formation de combinaisons à structure chimique toute différente que celle de la cellulose nitrée.

La teneur en H^2SO^4 et en HNO^3 peut varier dans des limites très étendues. Les propriétés de la cellulose nitrée sont d'autre part aussi en rapport avec la proportion de cellulose introduite dans le mélange des acides, la température pendant la réaction et la durée de l'action des acides sur le coton.

Lunge a effectué un grand nombre de recherches à ce sujet et il arrive aux conclusions suivantes : Le mélange acide doit renfermer presque à parties égales de H^2SO^4 et de HNO^3. La quantité serait d'environ 41 à 42 %, puis de 15,5 à 19 % d'eau, le mieux de 17 à 18 % et la teneur en oxydes nitriques (N^2 O^4) ne doit pas dépasser 1 %. Avec un mélange acide de ces quantités, on doit traiter la cellulose pendant 8 heures à + 20° ou pendant 2 heures à + 40° ou pendant 20 minutes à + 60°. Le coton nitré fabriqué à une température élevée se dissout plus facilement dans l'alcool-éther. Sur 1 partie de cellulose, on emploie environ 74 parties du mélange des acides nitrifiants.

D'autres auteurs font usage d'un mélange de 65 % d'acide sulfurique, de 16 % d'acide azotique et de 19 % d'eau. Une partie de coton est traitée à + 30° pendant 4 heures au maximum avec 60 parties de ce mélange nitrifiant.

La pharmacopée allemande prescrit un mélange de 80 parties d'acide azotique avec 61 à 65 % d'HNO^3 et 200 parties d'acide sulfurique brut avec environ 91 % d'H^2SO^4. Dans ces conditions, le mélange nitrifiant renferme 65 % d'H^2SO^4, 17,5 à 18,5 % d'HNO^3 et 17,5 à 16,5 % d'H^2O. On doit alors employer une partie de coton pour seulement 25,5 parties du mélange : acide nitrifiant. La réaction s'effectue à + 20° pendant 24 heures.

Après avoir ainsi donné un aperçu général sur l'historique de la question de l'ultrafiltration et des microbes ultrafiltrants et après avoir décrit les techniques employées avant nous et les résultats obtenus, nous arrivons, dans les chapitres suivants, à l'exposé de nos travaux personnels.

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

Chapitre Premier

Préparation du coton nitré et confection des membranes en collodion d'après nos techniques.

Nous avons procédé de la façon suivante pour la nitrification de la cellulose :

Dans un grand récipient en porcelaine, nous effectuons le mélange des acides, en ajoutant lentement par un jet continu un mince filet de l'acide sulfurique à l'acide azotique. D'après les auteurs cités dans le chapitre précédent, la proportion de $\frac{H^2\ SO^4}{H\ N\ O^3}$ peut varier dans de fortes limites, ainsi Sigaud indique que les deux acides non hydratés peuvent être mélangés à raison de 1 partie d'HNO^3. H^2O avec 0,6 à 3 parties d'H^2SO^4. H^2O.

Nous fondant sur ces faits, nous avons effectué nos expériences avec le mélange suivant :

Acide azotique à 18 % d'HNO^3	pur	28,5 gr.
Acide sulfurique à 65,5 % d'H^2SO^4	pur	71,5 gr.

Le mélange renferme donc 1 partie d'HNO^3 pour 3,6 parties d'acide sulfurique et la teneur en eau est de 16,5 gr. %.

Le mélange terminé, on attend jusqu'à ce que la température soit tombée à + 30°. On place alors le récipient en porcelaine dans un Bain-Marie réglé à + 30° pour travailler à une température stable et on introduit la cellulose dans le mélange des acides petit à petit en agitant. Il faut prendre la précaution de répartir la cellulose d'une façon homogène pour éviter la formation de grumeaux ou de boules. Nous avons employé du coton hydrophile ayant été traité préalablement 2 fois à + 120° par de l'acide acétique N/2. Le coton est ensuite lavé à l'eau distillée à plusieurs reprises sur des tamis en porcelaine pour pousser la déminéralisation à un certain degré. Nous ne conseillons pas d'aller trop loin, en traitant par exemple 4 fois ou plus le coton dans l'acide acétique, car ces celluloses complètement déminéralisées ne se prêtent plus favorablement à la préparation des ultrafiltres à la suite de leur trop grande fluidité et du nombre de couches en collodion qu'on sera alors obligé de superposer pour obtenir une membrane résistante.

Le coton lavé est ensuite séché à l'air pendant quelque temps et est prêt pour l'emploi : Quant à la proportion de coton à employer par rapport aux acides, SIGAUD dit :

« La proportion entre le bain et la quantité de coton à nitrifier est limitée par la nécessité mécanique que tout le coton soit imbibé à refus, ce qui fait que pour une molécule-gramme de HNO^3 on ne peut pas dépasser le 1/10 de molécule-gramme de cellulose $C^6\ H^{10}\ O^5$. »

Nous avons pratiquement employé, pour les quantités d'acides ci-dessus indiquées 8 à 10 gr. de coton déminéralisé.

Le mélange des acides ayant imbibé le coton est donc placé sur B. M. à 30° et toute l'opération doit être effectuée sous la hôte à cause des émanations de vapeurs acides et des vapeurs nitrées (N^2O et autres composés oxygénés de l'azote). Après avoir laissé au repos pendant une heure, on mélange bien avec une baguette en verre, on fait agir encore une heure et on mélange de nouveau. Ainsi on laisse les acides pendant 4 heures en contact avec la cellulose. On examine de temps en temps en prélevant des petites portions pour déterminer, si la cellulose est déjà transformée en coton azotique octonitré, qui répond seul aux conditions exigées pour notre usage.

A cet effet, on lave d'abord bien l'échantillon prélevé avec beaucoup d'eau, puis avec de l'alcool à 95°, on sèche et on examine la solubilité du coton dans un mélange éther-alcool à parties égales. On peut ainsi bien contrôler la marche de la réaction et le moment où la cellulose est transformée en coton octonitré. Toute la réaction s'effectue à peu près en 4 heures.

La nitrification ayant été atteinte, on enlève le coton, on l'exprime entre des tamis de porcelaine entre lesquels on le lave avec beaucoup d'eau ordinaire. Vers la fin du lavage, on emploie de l'eau additionnée d'une faible proportion de carbonate de soude pour neutraliser les dernières traces acides. Finalement on desserre les tamis sous l'eau carbonatée pour être sûr que les fibres cellulosiques soient bien lavées et qu'il n'y a pas de grumeaux ou de conglomérats non neutralisés.

Le coton octonitré préparé, a besoin d'être stabilisé ensuite. A cet effet, nous le chauffons pendant 6 à 10 heures à l'ébullition dans de l'eau contenant une petite quantité de carbonate de soude. Les éthers sulfuriques seront ainsi mis en liberté sous forme d'acide sulfurique, qui est neutralisé par le CO^3 Na^2. Le coton octonitré stabilisé est ensuite débarrassé de son eau de lavage par centrifugation et traitements successifs au moyen de l'alcool à 95°. Finalement nous conservons le coton octonitré stabilisé sous l'alcool à 95°.

La récolte d'après notre technique correspond environ pour 100 parties de coton hydrophile déminéralisé employé à 140 à 142 parties de coton octonitré stabilisé. Théoriquement, on devrait obtenir 160 parties.

Préparation des différents collodions pour la confection des ultrafiltres.

Nous avons déjà exposé antérieurement les différents facteurs qui interviennent pour la perméabilité plus ou moins grande des membranes en collodion. L'influence la plus importante à ce sujet revient naturellement à la composition de la solution de coton nitrique dans le mélange alcool-éther.

On doit varier la formule des solutions suivant les buts qu'on veut atteindre. Nous distinguons par exemple :

a) Ultrafiltration sous pression d'un liquide facilement altérable (Fig. 16) ;

b) Ultrafiltration par aspiration d'un milieu de culture stérile (Fig. 13 et 14) ;

c) Ultrafiltration d'une culture par introduction dans le péritoine ou dans une poche sous-cutanée chez un cobaye ou un autre animal de laboratoire.

Dans le premier cas, il importe d'obtenir une filtration rapide ; le filtrat doit être débarrassé de toute trace d'albumine, le passage des ferments et toxines à travers la membrane de l'ultrafiltre est sans importance et les filtres doivent supporter une assez forte pression (60 à 80 mm de Hg). A cet effet, nous préparons notre collodion de la façon suivante :

Alcool absolu	58 cmc.
Ether sulfurique anhydre	38 cmc.
Coton octonitré stabilisé	4 gr.
Acide acétique crist.	5 gr.

Dans le deuxième cas, où il importe d'avoir une membrane laissant passer les ferments et toxines, n'ayant aucune action inhibitrice sur l'ultravirus et se prêtant à la stérilisation, tout en étant bien perméable, nous avons toujours recours à la formule suivante :

Alcool absolu	48 cmc.
Ether sulfurique anhydre	48 cmc.
Coton octonitré stabilisé	4 gr.

Nous ajustons, si c'est nécessaire, le pH à 6,4 — 7,2 suivant les microbes envisagés.

Enfin, pour le troisième cas, où il s'agit d'obtenir des membranes très résistantes, garantissant le passage intégral des toxines ou des éléments ultrafiltrables sans risque d'infection bacillaire normale, même si *celle-ci est paucibacillaire*, nous employons la préparation suivante :

Alcool à 96°	40 cmc.	pH = 6,4 à 7,2
Ether sulfurique anhydre ..	56 cmc.	
Coton octonitré stabilisé ..	4 gr.	

Pour réunir les 3 produits, nous procédons de la façon suivante : Nous introduisons dans une large éprouvette le coton octonitré bien effiloché et nous y ajoutons l'alcool. Mélanger bien pour que tout le coton soit imbibé d'une façon homogène, puis ajouter l'éther sulfurique. Boucher hermétiquement l'éprouvette avec un bouchon en liège et agiter fortement pendant quelques minutes. Ouvrir ensuite le flacon pour éviter une trop grande pression à l'intérieur qui pourrait faire éclater le verre. Reboucher et laisser reposer la solution pendant quelques heures pour qu'elle se débarrasse de l'air. Conserver à l'abri de la lumière.

L'addition de l'acide acétique dans la première préparation ne doit se faire qu'au moment de l'emploi, car les collodions acétisés ne se conservent que peu de temps.

Cependant, la solution du coton octonitré dans l'alcool-éther doit mûrir au moins pendant 8 jours avant l'emploi, car les membranes préparées à partir d'un collodion frais sont moins homogènes et résistantes que celles préparées au moyen d'un collodion mûri. A cet effet, on place la solution dans un flacon bien bouché pendant environ 8 jours à l'étuve à + 37°. Ensuite, on doit placer le collodion au frais et à l'abri de la lumière, où ils conserve fort longtemps.

Préparations des sacs de collodion.

Pour la préparation des sacs de collodion, nous nous sommes servi de la technique indiquée par SIGAUD, qui pour un manipulateur un peu exercé présente de grands avantages sur tous les autres procédés, que nous avons expérimentés au cours de notre travail.

Nous avons utilisé à cet effet des mandrins qui avaient tous la même forme que celle indiquée par SIGAUD, mais les dimensions des différents mandrins variaient suivant l'emploi auquel l'ultrafiltre est destiné.

Le mandrin destiné à donner la forme au sac de collodion est un tube de verre fermé et arrondi des deux côtés, portant un renflement au 2/3 de sa longueur dont le diamètre le plus grand est de 40 mm (Fig. 15*a*).

Les dimensions de nos mandrins sont les suivantes :

a) Sacs de collodion pour filtration à pression : 13/90 mm.
b) — — pour filtration à aspiration : 17/100 »
c) — — pour implantation à l'animal : 10/30 »

Ces mandrins sont lavés et nettoyés par immersion pendant au moins 30 minutes dans une solution sulfo-chromique, puis on les lave à l'eau du robinet et à l'eau distillée. On sèche à l'étuve par stérilisation à l'air sec et, au moment de l'emploi, on n'oubliera pas de bien sécher une seconde fois sur l'air chaud au-dessus d'un four électrique, de sorte que le mandrin au moment où on l'introduit dans le collodion, a environ une température de + 37° à + 42°. Ceci pour éviter l'adhésion de toutes petites gouttelettes d'eau sur les parois du mandrin occasionnant des dilutions imprévues de la solution de collodion et une répartition inégale et non homogène du collodion, de sorte que la membrane de l'ultrafiltre deviendrait défectueuse avec des espaces intermicellaires irréguliers. Nous insistons tout particulièrement sur ce fait, que nous avons étudié avec le plus grand soin, car par cette manipulation que nous trouvons indispensable, nous nous plaçons en contradiction avec BEAUVERIE. Cet auteur dit que la température du moule doit être inférieure à celle du collodion dans lequel on le trempe pour former la membrane. « Sinon des bulles d'air se produisent par évaporation de l'éther au contact de la paroi du moule ». Mais nous préférons cette évaporation de l'éther à la présence de gouttelettes d'humidité qui occasionnent la formation de membranes non homogènes.

Pour porter le collodion sur le mandrin, nous introduisons le collodion dans une éprouvette de hauteur appropriée à la longueur des mandrins et de diamètre légèrement plus grand que celui du renflement du mandrin.

Nous plongeons d'un seul coup la partie longue du mandrin chaud dans le collodion, jusqu'au milieu du renflement en tenant le mandrin par son extrémité courte ; on verra alors les nombreuses bulles gazeuses se former et monter à la surface du collodion. Par des petites secousses, on peut accélérer l'ascension des bulles. Si toutes les bulles ont disparu, nous attendons encore 20 secondes, puis nous re-

tirons lentement et progressivement le mandrin du collodion. Si l'opération a été bien faite, il ne doit plus s'écouler de goutte de colodion au moment où le mandrin en est sorti. On tourne alors le mandrin en position horizontale rapidement entre les doigts pour répartir d'une façon homogène le collodion et on laisse sécher dans l'air chaud au-dessus du réchaud électrique à environ + 30° pendant 60 secondes. Puis on introduit le mandrin une seconde fois dans le collodion jusqu'au milieu du renflement; on le laisse pendant 60 secondes, puis on le retire encore lentement; on sèche de nouveau en roulant le mandrin horizontalement entre les doigts à environ + 30° pendant 60 secondes. A ce moment, on plonge le mandrin dans un récipient renfermant de l'eau distillée froide.

Cette manipulation a deux buts; si la membrane est trop desséchée, elle se détache très difficilement du mandrin et c'est justement ce décollage entre le sac de collodion et le mandrin qui constitue le point délicat de la technique de Malfitano-Sigaud.

D'autre part, cette introduction du sac de collodion sur le mandrin dans l'eau élimine l'excès du solvant éthéré par diffusion et c'est très probablement parce que l'eau le remplace que la membrane reste poreuse et devient perméable. En effet, nous savons que les membranes de collodion n'ont pas de véritables pores, comme les bougies de Chamberland ou de Berkefeld par exemple, mais de simples espaces intermicellaires. Nous avons affaire avec une substance gélifiée comparable à une membrane cellulaire organique. On sait que ces tissus cellulaires sont constitués par des cellules qui sont seulement rapprochées les unes aux autres et séparées par une couche de substances liquides qui forme ainsi des espaces intermicellaires.

« Le passage à travers les parois de collodion n'est donc pas un passage par des pores, mais bien à travers des espaces intermicellaires ».

On comprend que ces espaces soient d'autant plus petits que la paroi du collodion est plus dense, et d'autant plus amples, au contraire, que cette paroi est moins compacte. D'où la nécessité dans ce genre de recherches d'employer des

sacs de collodion à parois d'une structure aussi uniforme que possible.

D'autre part, Bigelow (51) et Gemberling (52) ont pu établir deux règles concernant le passage des colloïdes à travers les ultrafiltres.

1° Pour une membrane, le débit est proportionnel à la pression si la température reste constante.

2° Le débit varie avec la température suivant la loi du passage d'un liquide à travers un tube capillaire.

Duclaux et Errera ont contrôlé ces expériences et sont arrivés aux conclusions suivantes :

1° « La filtration sur membranes ultrafiltrantes suit les mêmes lois que l'écoulement à travers les tubes capillaires, tout au moins en ce qui concerne l'influence de la pression et la température.

2° Si l'on néglige des petites perturbations, les vitesses de filtration des solutions aqueuses sont en raison inverse de leur viscosité.

3° Les petites perturbations sont imputables à la plus ou moins grande conductibilité des solutions, indépendant de la concentration en ions H+.

4° La membrane ultrafiltrante se comporte comme un faisceau de tubes capillaires rigides, dont la structure est indépendante de la nature du liquide qui les baigne.

5° La solubilité, la tension superficielle, la réaction du liquide et sa pression osmotique, n'ont sur la membrane qu'un effet négligeable.

6° Il s'ensuit que l'eau, ou les autres liquides qui gonflent la membrane, sont retenus par une action purement physique.»

Ces conclusions s'étendent à tous les liquides qui n'exercent pas sur la membrane d'action dissolvante ou ramolissante.

L'introduction du mandrin muni de son enveloppe en collodion dans l'eau, doit donc être effectuée dans des conditions toujours identiques, surtout en rapport avec le séchage, le temps et la température.

Cette manipulation menée à bien, on procède immédiatement au décollement et à l'enlèvement du sac de collodion. Nous procédons de la façon suivante :

Un grand tube à essai ayant 42 mm de diamètre et 120 mm de hauteur, muni d'un ajutage avec robinet à son 1/3 supérieur, est relié au moyen de ce petit tube d'ajutage avec la trompe à eau (Fig. 15*b*). Le mandrin avec l'ultrafiltre en collodion est entouré directement au-dessous de renflement d'une bague en caoutchouc (bouchon perforé) ouverte par une incision radiaire, de façon à ce qu'on puisse écarter facilement les deux bouts sectionnés et glisser, sans peine et danger de déchirure, l'anneau autour du mandrin (Fig. 15 *a* et *b*). L'anneau a un diamètre de 43 mm et le trou situé en son milieu, a le même diamètre que le mandrin. On mouille alors le tout à l'eau distillée et on décolle au moyen d'un scalpel le sac de collodion entourant le renflement du mandrin. La pellicule de collodion, en se repliant, vient alors s'appliquer intimement à la surface de l'anneau en caoutchouc. Puis on monte le mandrin à l'aide de l'anneau sur le grand tube à essai relié à la trompe à eau. On commence à faire le vide en réglant la pression à l'aide du petit robinet. Habituellement on n'a pas besoin de dépasser 15 à 25 mm de Hg pour obtenir le décollement en bougeant avec précaution le mandrin pour faire arriver l'air entre la membrane de collodion et le mandrin même.

On démonte alors le mandrin du tube à vide, on enlève, en écartant les deux sections, l'anneau en caoutchouc et on peut facilement retirer le sac de collodion de son mandrin.

On obtient ainsi un sac en forme de petit cylindre avec des parois en double couche de collodion, que nous introduisons immédiatement dans de l'alcool à 70°, afin d'éviter un dessèchement de la membrane et pour en obtenir une résistance suffisante pour monter ensuite le sac.

La stérilisation de nos filtres en collodion a été toujours réalisée par la technique que nous décrivons ci-dessous.

Les méthodes de stérilisation indiquées par les différents auteurs présentent en effet des défauts et des inconvénients, qui nous ont obligés à appliquer une technique, dont nous avons examiné préalablement les qualités; elle ne modifie pas la perméabilité et la résistance des ultrafiltres et garantit une stérilité rigoureuse.

Nous ne pouvons pas recommander le procédé de dénitrage, ni la stérilisation dans les vapeurs d'alcool à l'autoclave.

Nous procédons de la façon suivante : Retirer les sacs du bain alcoolique et les débarrasser de l'alcool au moyen d'une pipette stérile.

Préparer une solution d'antiseptique, dont l'effet inhibiteur et toxique pour les microbes a été étudié dans les laboratoires du Prof. SARTORY par WIDDER (53). Voici sa composition :

Sublimé	0,2 gr.
Vuzine	0,2 »
Metaxylenol	0,2 »
Sunoxol	0,2 »
Eau distillée	1000 cc.

On remplit les sacs de collodion au moyen d'une pipette stérile avec cette solution, puis on les place dans des verres cylindriques remplis du même liquide, et fermés à l'aide d'un bouchon à émeri. Le tout est ensuite placé à l'étuve à + 37° pendant 4 jours. Les spores les plus résistantes sont ainsi tuées.

Après ce temps, on retire les sacs de la solution aseptique, on les vide au moyen d'une pipette stérile et on procède stérilement au grand lavage par eau distillée stérilisée pour enlever toute trace d'antiseptique. Cette stérilisation est pratiquée après le montage des sacs en collodion sur des tubes à support en verre, appelés par SIGAUD : « Manchons ».

Le montage du sac de collodion pour la filtration.

Suivant qu'on envisage l'usage de l'ultrafiltre pour la filtration par pression, par aspiration ou pour l'implantation dans les tissus animaux, nous employons des techniques de montage différentes.

Pour l'ultrafiltration par pression, nous nous servons d'un manchon en tube de verre de dimension égale au mandrin. Le manchon est ouvert des 2 côtés. Au tiers supérieur nous avons soufflé un renflement servant comme entonnoir. Les 2/3 inférieurs ont 60 mm. de longueur et l'extrémité ouverte est légèrement étirée sur 5 mm. de longueur, pour faciliter le montage des sacs de collodion. Nous adaptons sur ce tube un large anneau de caoutchouc au-dessus de

l'ultrafiltre (Fig. 15*c* et *d*). Le caoutchouc s'adaptant hermétiquement sur le manchon, colle l'ultrafiltre sur le verre et aucun danger de fuite ne peut exister. On lave à l'eau bidistillée stérile et on remplit alors le manchon de l'ultrafiltre avec le liquide à filtrer. On le fixe à un système fournissant la pression (une pompe électrique à air ou une pompe à azote), et on filtre par pression positive de 20 à 60 mm. d'Hg.

Pour l'ultrafiltration par aspiration que nous employons la plupart du temps pour les liquides qui doivent rester stériles, nous avons construit un appareil très simple, donnant entière satisfaction. Le montage des sacs en collodion sur le manchon reste le même. Le manchon garde la même forme. Le tout est ensuite fixé sur un long tube-filtre, type rallonge SOXHLET, se terminant à sa partie supérieure par une zone rodée et à son extrémité inférieure par un tube de diamètre plus petit et d'environ 100 mm. de longueur.

Cette rallonge est montée sur un ballon d'ERLENMEYER à vide par un bouchon en caoutchouc fixé sur sa partie inférieure étirée. L'ensemble est stérilisé préalablement.

Puis on adapte sur l'extrémité supérieure, rodée, de la rallonge, le manchon avec le sac en collodion au moyen d'un bouchon en caoutchouc coupé par incision longitudinale, afin de permettre facilement la fixation du bouchon autour du manchon au niveau de l'anneau en caoutchouc qui fixe le sac de collodion sur le manchon.

Le petit appareil (Fig. 14), complètement stérile, est ainsi prêt pour la filtration. On aspire par pression négative le liquide ultrafiltrable au moyen d'une trompe à eau dans un petit tube à essai placé dans le flacon d'ERLENMEYER à vide (pression 40 à 50 mm. d'Hg).

En ce qui concerne le montage des ultrafiltres pour l'implantation dans les tissus animaux, nous avons employé la technique de SANARELLI et ALESSANDRINI (54), avec quelques petites modifications.

Comme manchon, nous utilisons donc les parties antérieures d'ampoules à 2 cc^3 de volume, munies de leur extrémité effilée.

Nous enlevons le fond et rodons légèrement à la flamme Ces petits manchons ainsi préparés sont ensuite nettoyés comme toute notre verrerie par lavage au liquide sulfo-

chromique, à l'eau ordinaire puis à l'eau distillée. Ensuite, pour garantir un joint hermétique entre le sac de collodion et le manchon, il faut préalablement enduire le manchon avec un mastic spécial. Nous procédons d'après la technique de SIGAUD :

La pose d'un enduit en vernis cellulosique spécialement composé pour obtenir une adhérence plus sûre et plus stable que celle du collodion ordinaire, est nécessaire du fait que le collodion ordinaire forme sur le verre des pellicules qui, desséchées ou humectées, se détachent très facilement. Dans ce but, nous conseillons d'opérer ainsi :

a) On plonge sur une longueur de 1 cm. environ la partie décapée du manchon tant à l'intérieur qu'à l'extérieur, dans une solution de mastic à 4 % dans l'alcool-éther; on laisse sécher à l'air libre en tournant d'abord pour répandre uniformément le vernis et on porte ensuite dans une étuve à 80-100°.

b) On répète la même opération en plongeant la même extrémité dans un mélange à parties égales de collodion à 4 % et de mastic à 4 %. Dans ce cas aussi il est préférable, mais non indispensable, de parfaire la dessiccation à l'étuve.

c) On doit poser une 3e couche d'enduit en plongeant le manchon dans du collodion additionné d'huile de ricin à 2 % pour rendre l'enduit imperméable à l'eau qui pourrait le détériorer. Sur le collodion au mastic, et à l'huile de ricin, le collodion ordinaire, même humecté, reste suffisamment adhérent.

Ayant ainsi fixé hermétiquement le sac de collodion sur son manchon, on stérilise et remplit celui-ci avec la culture. Puis on scèle à la flamme l'effilure de l'ampoule assez près du renflement. On entoure la partie du verre de l'ampoule au moyen du mastic de SANARELLI, à savoir :

Térébenthine de Venise Colophane Gomme laque	Parties égales à 150°.

L'ampoule est ainsi couverte et protégée par une calotte robuste, hermétique, imperméable et bien adhérente. Toutes les manipulations doivent être effectuées avec stérilité et on

place chaque fois dans des boîtes de PETRI ou des tubes de BORREL stériles.

Le sac de collodion ainsi rempli et fermé est prêt pour être introduit dans le péritoine du cobaye ou du lapin.

Ayant ainsi donné en détail les techniques de préparation de nos ultrafiltres, nous arrivons dans le chapitre suivant à la description des résultats d'ultrafiltration de nos organismes.

Nous résumons encore d'après HAUDUROY, les précautions à prendre dans l'ultrafiltration : « Le liquide à filtrer doit être aussi peu visqueux que possible. Noter sa réaction en se souvenant que l'alcalinité favorise la filtration; noter la température du liquide; ultrafiltrer sous une pression peu élevée; noter la durée de l'opération qui sera forcément assez longue. Eprouver le filtrat à l'étuve. Inoculer une grande quantité de liquide, les éléments ultrafiltrants ayant peut-être traversé la membrane en très petit nombre ».

Nous nous sommes efforcés au cours des expériences que nous allons décrire, de toujours remplir ces conditions et de tenir compte de ces facteurs dans nos protocoles de recherches.

Chapitre II

Le cycle évolutif des Actinomyces dans les cultures pures après passage à travers l'ultrafiltre de collodion.

Dans un travail publié à l'Académie de Médecine, A. et R. Sartory et J. Meyer (55) ont exposé le résumé de recherches effectuées sur un *Actinomyces bovis* Harz. Celui-ci n'a pu être mis en évidence dans les lésions pathologiques humaines par suite de l'absence de grains et de tout autre caractère spécifique utilisé pour le diagnostic histologique des *Actinomycoses*.

L'examen direct des prélèvements opérés au moyen de frottis, montrait à l'investigation microscopique de rares éléments cocciformes intracellulaires disposés en petites chaînettes de 2 à 4 éléments, mesurant 1 μ de diamètre et plus, ne rappelant à première vue aucunement les formes d'un *Actinomyces*.

Depuis lors, les auteurs ont eu l'occasion d'étudier trois autres prélèvements pathologiques provenant : l'un d'un mycétome déformant, très caractéristique avec fistulisation ; les deux autres de lésions osseuses, l'une dans la région tibio-tarsienne, l'autre occasionnant une ostéomyélite du fémur.

L'étude bactériologique directe de ces cas a montré dans les deux premiers les mêmes éléments cocciformes ; dans le troisième aucun parasite n'a été mis en évidence, malgré l'aspect clinique rappelant à tous points de vue celui des cas précédemment cités et se différenciant nettement de la *tuberculose* et de *tumeur*.

La culture des prélèvements pathologiques de ces divers malades effectués sur milieu de SABOURAUD liquide n'a donné en aérobiose aucun résultat; par contre, les mêmes milieux disposés en anaérobiose ont fourni des cultures positives montrant des éléments en forme de massues toujours GRAM négatives et renfermant des granulations GRAM positives; d'autre part, les auteurs notent la présence de très rares filaments ramifiés, GRAM négatifs.

Dans un travail antérieur (55 *bis*) ils ont déjà indiqué une première partie de ces expériences effectuées au moyen d'inoculations par voie intrapéritonéale et intracardiaque et après filtration sur bougies BERKEFELD LI-bis des cultures; les inoculations intracardiaques effectuées au moyen des filtrats ont donné des résultats très probants, équivalents pour les deux préparations employées. Les cobayes, après avoir survécu trois mois ont présenté une diminution notable de poids et les chercheurs ont jugé utile de les sacrifier. On note à l'autopsie les caractères suivants :

Rate hypertrophiée, granuleuse, sans tubercules apparents.

Foie fortement congestionné, parsemé de petits nodules jaunâtres.

Poumons congestionnés et œdémateux.

Les ganglions rétrosternaux, lombaires et bronchiaux sont hypertrophiés, alors que l'on ne remarque pas d'adénopathie dans la région inguinale.

L'examen histologique de ces organes donne : pour la rate une prolifération très nette de l'endothélium des travées spléniques avec des petits follicules mêlés par endroits à de nombreux noyaux de cellules en voie de dégénérescence. On note un centre follicullaire rose homogène, de nombreux polynucléaires et une couronne de cellules réticulo-endothéliales qui prolifèrent. Dans le foie, on voit de petits nodules semblables à ceux de la rate, mais dont la nature mycosique est ici beaucoup plus marquée; nulle part on ne trouve de formations mycéliennes typiques. Le poumon présente une alvéolite végétante, par endroits très prononcée, avec de nombreux éléments inflammatoires qui évoluent dans la trame des alvéoles pulmonaires. Ici aussi, pas de nodules actinomycosiques.

Des prélèvements effectués sur ces différents organes et ensemencés suivant la technique indiquée ont toujours abouti au même résultat. De nouvelles inoculations pratiquées directement par voie intrapéritonéale chez le lapin à partir du matériel pathologique provenant d'un premier passage sur l'animal, ont toujours amené une actinomycose typique avec présence de grains microscopiques dans les coupes histologiques.

Les deux parasites isolés et cultivés sur les différents milieux présentaient les mêmes caractères morphologiques et biologiques : ils rentrent dans le sous-genre des *Euactinomyces*, section des *Parasitici*, sous-section des Majores, selon la classification de LANGERON.

Au cours de ces travaux, A. et R. SARTORY, J. MEYER et ANTONIOLI en appliquant aux Actinomyces en étude les techniques de culture basées sur l'augmentation de la concentration des milieux et sur le passage successif en aérobiose et en anaérobiose, d'une part, et celles de coloration et de fixation par les méthodes de SCHUMACHER (56) modifiées, de l'autre, ont pu mettre en évidence des corpuscules chromatiques des noyaux et ont différencié la nature des diverses inclusions. Ils ont eu la possibilité d'observer des configurations et des stades particuliers qu'ils rapportent au phénomène sexué chez les *Actinomyces*, tel que nous l'avons exposé dans notre historique. On a ainsi pu entrevoir différentes modifications évolutives dans la morphologie des *Actinomycètes ;* ceci nous a fait penser à la possibilité de l'existence d'un cycle évolutif chez ces agents pathogènes.

L'examen des prélèvements pathologiques, d'autre part, avec les éléments cocciformes rappelant fortement les corpuscules chromatiques nucléaires des cultures et les rudiments filamentaires GRAM négatifs nous a fourni des faits propres à fortifier notre hypothèse.

En effet, A. et R. SARTORY et J. MEYER ayant constaté que l'on peut rencontrer chez l'homme des lésions rappelant cliniquement des pseudotumeurs à évolution lente dans lesquelles les formes mycéliennes et les grains font complètement défaut, que d'autre part l'inoculation aux animaux de laboratoire de filtrats de culture obtenus par passage à travers la bougie BERKEFELD confère à ceux-ci une maladie

complètement atypique, que par un second passage sur l'animal, on arrive à produire une actinomycose caractérisée par la présence de filaments mycéliens et de grains, nous avons jugé utile de reprendre ces études sur une base nouvelle afin d'examiner dans des conditions rigoureuses la possibilité du passage d'éléments actinomycétiques à travers les membranes d'ultrafiltres.

Dans cet ordre d'idées, nous avons employé la technique de préparation des sacs de collodion indiquée dans le chapitre précédent. Nous avons utilisé l'appareil d'ultrafiltration que nous avons décrit pour filtrer par aspiration avec toutes les garanties d'une asepsie rigoureuse.

Nous avons préparé des cultures d'une souche d'*Actinomyces Bovis* fournie par la *Mycothèque* de *Baarn* d'un côté et, d'autre part, nous avons eu recours à l'espèce qui a été isolée par A. et R. Sartory et J. Meyer sur deux malades, dont nous donnerons plus loin les observations cliniques en détail.

Dans ce but, nous avons effectué des cultures de nos deux espèces d'*Actinomyces* sur milieu de Sabouraud glucosé solide au pH = 4,8. Le 21e jour, nous avons repiqué ces cultures sur nouveau milieu maltosé liquide au pH = 7,2. Afin d'enrichir la culture et d'obtenir une récolte plus abondante, nous avons ensemencé chaque nouveau milieu avec 2 oeses de fil de platine. Les 2 ensemencements étaient espacés l'un de l'autre d'une période de 24 heures. 48 heures après le dernier ensemencement et après séjour à l'étuve à 27°, nous avions un milieu liquide fortement troublé et renfermant un sédiment abondant de flocons blancs. La culture en milieu à pH = 7,2 est nécessaire pour favoriser le passage des éléments ultrafiltrants éventuels, comme nous l'avons mentionné plus haut. Ainsi pour la mosaïque du tabac, on a constaté que le virus ultrafiltre seulement, tout en étant rendu inopérant, si on l'alcalinise jusqu'à pH = 8, mais qu'il reprend de nouveau sa virulence si on diminue de nouveau l'alcalinité (Quanjer) (57).

Les tubes de cultures étaient ensuite agités et vidés stérilement dans des flacons d'Erlenmeyer fixés sur un agitateur électrique et contenant des perles de verre stérilisées et de la glycérine stérile, dans des proportions telles, que

15 parties de glycérine correspondaient à 85 parties de milieu liquide.

Les Erlenmeyers étaient bouchées hermétiquement au moyen de bouchons en caoutchouc préalablement stérilisés à l'étuve à + 105°. Nous avons pour chaque expérience effectué une agitation pendant 8 heures, suffisante pour broyer les flocons culturaux. Chaque flacon Erlenmeyer renfermait environ 25 cc^3 de milieu que nous avons après l'agitation introduit dans l'entonnoir-manchon d'un de nos appareils stérile pour l'ultrafiltration par aspiration.

La filtration était opérée sous une pression négative de 40 mm. de mercure à une température de 18° et les 25 cc^3 de culture mettaient environ 4 heures à passer à travers la paroi des sacs de collodion.

Le filtrat était récupéré dans un large tube de culture stérile placé à l'intérieur du ballon d'Erlenmeyer à vide et fermé au moyen d'un tampon de coton non comprimé.

Nous insistons sur la nécessité d'ajouter pour le broyage de la glycérine, car des milieux de culture broyés sans prendre cette précaution donnaient des résultats inconstants. Lors de nos recherches de documentation pour l'explication de ce fait, nous avons pu constater que les virus ultrafiltrants présentent une résistance prononcée contre l'effet de certains antiseptiques. Ainsi l'alcool, l'éther, l'acétone déterminent dans des liquides albumineux la formation d'un précipité, qui englobe et protège les ultravirus renfermés dans le liquide albumineux. D'autre part, Johnson (58) et Beauverie constatent que la glycérine pure n'altère pas la vitalité de la plupart des ultravirus et permet même de les conserver.

Nous croyons donc que l'addition de la glycérine, indispensable pour mener à bien l'expérience, intervient comme agent protecteur des particules ultrafiltrables.

Afin de réaliser toutes les garanties d'asepsie, nous avons effectué pour chaque expérience deux contrôles différents :

Une petite portion du filtrat était chaque fois placée telle que à l'étuve à + 27° et devait rester stérile si l'opération avait été conduite dans les conditions exigées.

Une autre partie du filtrat servait pour l'examen direct au moyen de frottis colorés par le Violet de Gentiane, après

centrifugation pendant 20 minutes à 4000 tours. L'examen microscopique ne devait montrer aucun microbe ou granulations.

Les 15 cc^3 de filtrat, qui restaient, étaient alors seulement employés pour continuer nos expériences.

On prépare un milieu peptoné-maltosé liquide à pH = 7,2.

On mélange stérilement au-dessus de la flamme 5 cc^3 de ce milieu avec 5 cc^3 du liquide ultrafiltré.

On obtient ainsi 3 tubes renfermant 10 cc^3 du mélange, dont on place 2 en aérobie, un à l'étuve à + 27° et l'autre à l'étuve à + 37°. Le 3e tube a été disposé pour chaque expérience dans l'étuve à vide d'Adnet, où nous avions maintenu un vide de 2 à 4 mm. de Hg, en employant la trompe à *Mercure de* Weiss pour réaliser un vide aussi complet que possible.

Les tubes placés en aérobiose ne présentaient aucune modification pendant les 4 semaines au cours desquelles nous les avons toujours observés. Au bout de 48 heures, de 8 jours et de 4 semaines de séjour à l'étuve, nous avons, pour avoir toutes les garanties, effectué chaque fois des frottis colorés au moyen des méthodes de Gram et de Ziehl-Neelsen. Ces examens microscopiques ont toujours donné des résultats négatifs et ceux-ci constituent une preuve de la stérilité de nos manipulations, de la rigueur de nos techniques d'ultrafiltration et de l'état parfait de nos sacs de collodion, ne laissant ultrafiltrer aucun élément actinomycétique ordinaire et ne subissant aucune déchirure lors de l'ultrafiltration sous pression négative.

Les tubes placés en anaérobie dans l'étuve d'Adnet renfermant le mélange : milieu maltosé-peptosé + ultrafiltrat, par contre se troublaient après 48 heures de séjour à l'étuve. Nous avons jugé utile de laisser les cultures évoluer encore pendant 48 heures et on a alors effectué après 4 jours de culture des frottis colorés aussi par la méthode de Gram et de Ziehl-Neelsen.

A ce moment, on constate au moyen de la coloration de Gram des éléments en forme de colonies irrégulières, constituées par des massues ou des sortes de bâtonnets boursoufflés, plus ou moins amorphes : Gram négatifs. Ces colonies

roses portaient des petites granulations à la limite de la visibilité qui étaient par contre nettement GRAM positifs.

Nous avons vérifié à plusieurs reprises l'apparition de ces formes qui ne pouvaient provenir que d'éléments actinomycétiques aptes à passer les ultrafiltres en collodion, et toujours nous avons pu constater ces phénomènes. Au moment de l'examen, nos milieux de cultures étaient à un pH de 6,8 — 7,1.

Nous croyons que ces stades doivent être comparés à ce que l'école allemande appelle « *Symplastes* » et peut être les petits grains GRAM + ne représentent que l'élément « *Mych* » d'ENDERLEIN. (Fig. 10 *b*).

La méthode de ZIEHL-NEELSEN nous a donné la preuve qu'il n'y avait pas d'élément acido-résistant.

Si on garde les cultures toujours à l'étuve à vide, on ne constate aucune évolution de ces formes et elles présentent un stade fixé.

Par réensemencement après 4 jours de culture en anaérobiose sur milieu de SABOURAUD maltosé, ou glucosé ordinaire les germes ne se multiplient pas ni en aérobiose ni en anaérobiose. Par contre, si on prend la précaution d'ajuster ces milieux maltosés liquides à un pH de 7,1 à 7,3, on obtient dans l'étuve à + 27° en aérobiose le 4e jour après l'ensemencement, un milieu floconneux, blanc-grisâtre, que nous avons examiné au microscope au moyen de frottis colorés par la méthode de GRAM.

On constate que les flocons sont constitués par des colonies GRAM positives en bâtonnets ou en massues irrégulières, cohérentes et ramifiées, ressemblant fortement à des formes d'involution caractéristiques du bacille pseudo-diphtérique. (Fig. 12 *b*).

Les cultures sont toujours très pauvres, à propriétés morphologiques fixées. La méthode de SCHUMACHER modifiée, montre au microscope un protoplasme homogène contenant un ou deux corpuscules nucléaires par élément. Le pH du milieu oscille toujours entre 6,9 et 7,2 ; nous avons contrôlé ces faits pendant des périodes de 4 semaines. Les réensemencements effectués sur des milieux de même constitution, ont toujours donné des résultats analogues.

Des repiquages pratiqués avec la même souche âgée de 4 jours sur milieu de SABOURADD glucosé solide à un pH de 5,8, donnent encore des formes pseudodiphtériques. Les cultures sont toujours durant une période de 72 heures après l'ensemencement peu luxuriantes et forment une légère pellicule blanchâtre sur la surface du milieu. Mais à partir du 4e jour, les frottis colorés au moyen de la méthode de SCHUMACHER mod. montrent une évolution cytologique progressivement croissante. Les éléments bacillaires ou en massue, ont subi une légère hypertrophie, de sorte que l'irrégularité morphologique devient encore plus apparente. On note la formation des ampoules vacuolaires, le protoplasme se disloque et se concentre sur certaines zones cellulaires seulement. Au niveau de cette concentration protoplasmique, le corpuscule nucléaire a subi une fragmentation très intense et la matière nucléaire semble se disperser dans toute la masse cytologique. Vers le 8e jour, on constate toujours les mêmes colonies polymorphes, mais on note l'apparition de formes en T ou en Y (double Y) décrites déjà par LIESKE (59) sous le nom de « *Vierhyphenspore* » et dont ANTONIOLI a pu déterminer la valeur dynamogénétique sexuée; le même auteur a fixé le rôle reproducteur que ces éléments acquièrent dans le cycle évolutif des *Actinomyces*.

Les cultures évoluent ensuite suivant les conditions de milieu et de température.

Après 15 jours ou 4 semaines, l'aspect morphologique reste invariable dans la culture mère même, c'est-à-dire sur milieu de SABOURAUD glucosé solide à pH = 5,8. En vieillissant, le milieu s'acidifie encore légèrement.

Réensemencées sur milieu de SABOURAUD maltosé liquide à pH de 7,1 ou 7,2, les formes pseudodiphtériques ou biodynamogènes évoluent au cours du 4e au 7e jour vers une forme très atypique et invariablement fixée. Par examen au moyen de frottis colorés par la méthode de GRAM, on voit de longues chaînettes d'éléments cocciformes, ressemblant à s'y méprendre à des Streptocoques. Ils sont GRAM positifs et se différencient pour le chercheur expérimenté par différents caractères des véritables Streptocoques. Les éléments cocciformes sont de taille irrégulière, leur diamètre s'accroît progressivement d'un bout à l'autre de la chaînette. La forme

sphérique est très rare, on note surtout des coques ovalaires ou même rectangulaires. La disposition en diplocoques, si caractéristiques chez la plupart des Streptocoques, fait défaut. Les espaces intercorpusculaires sont ou très irréguliers ou très petits et la chaînette paraît alors très homogène. (Fig. 12 *a*).

Ces cultures sont très luxuriantes. Le milieu de SABOURAUD maltosé liquide reste clair et il se forme un dépôt floconneux au fond du tube. Le pH initial de 7,2 passe vers le 4^{e} ou 7^{e} jour à une légère acidité, dont la limite supérieure a été fixée par nous = à 6,5. Mais à partir du 8^{e} jour, la concentration en ions H diminue de nouveau et finalement la culture reste en alcalinité.

Sur bouillon peptoné maltosé, les phénomènes se passent d'une façon tout à fait analogue. La culture est encore luxuriante et le bouillon reste clair. L'aspect morphologique demeure invariable.

Sur bouillon peptoné glucosé et SABOURAUD glucosé liquide, la culture est pauvre.

Sur milieu de SABOURAUD maltosé solide à pH = 7,2 ou 5,8, la souche pseudostreptococcique, issue de culture pseudodiphtérique sur milieu alcalin, conserve ses caractères morphologiques, même après 4 passages successifs. Mais on constate souvent que la fragmentation des chaînettes devient irrégulière, on note la présence de bâtonnets ou de petits filaments munis de ramifications latérales en forme de bourgeon. Cet aspect rappelle plutôt les formes lévuriennes bourgeonnantes des Schizosaccharomyces.

Des formes « pseudostreptocoques » analogues ont été décrites par LUCKSCH (60), qui a effectué des essais d'ultrafiltration de l'*Actinomyces Bovis* à travers les parois de Bougies de CHAMBERLAND et BERKEFELD. En employant des cultures âgées et la bougie CHAMBERLAND L 3, l'auteur a toujours obtenu sur bouillon ordinaire ces formes similant des streptocoques. Il donne nettement la preuve de la pureté de ses cultures et de l'origine cryptogamique pure de ces éléments.

Nous tenons à insister encore sur ce fait et croyons que les différenciations morphologiques et culturales que nous avons données, suffisent pour prouver l'exactitude de nos

manipulations et pour conclure que les éléments ultrafiltrables de l'*Actinomyces Bovis* standard et d'un *Actinomyces pathogène* isolé dans nos laboratoires, ont évolué vers un stade pseudostreptococcique, qui a des propriétés morphologiques très stables et définitivement fixées. Issues d'une phase de symplaste et d'une souche à caractères dynamogénétiques accrus, ressemblant à des formes pseudodiphtériques, ces cultures streptococciques constituent un stade évolutif, pourvu d'un pouvoir de « *Mochlose* » très prononcé, incapable de revenir aux formes initiales.

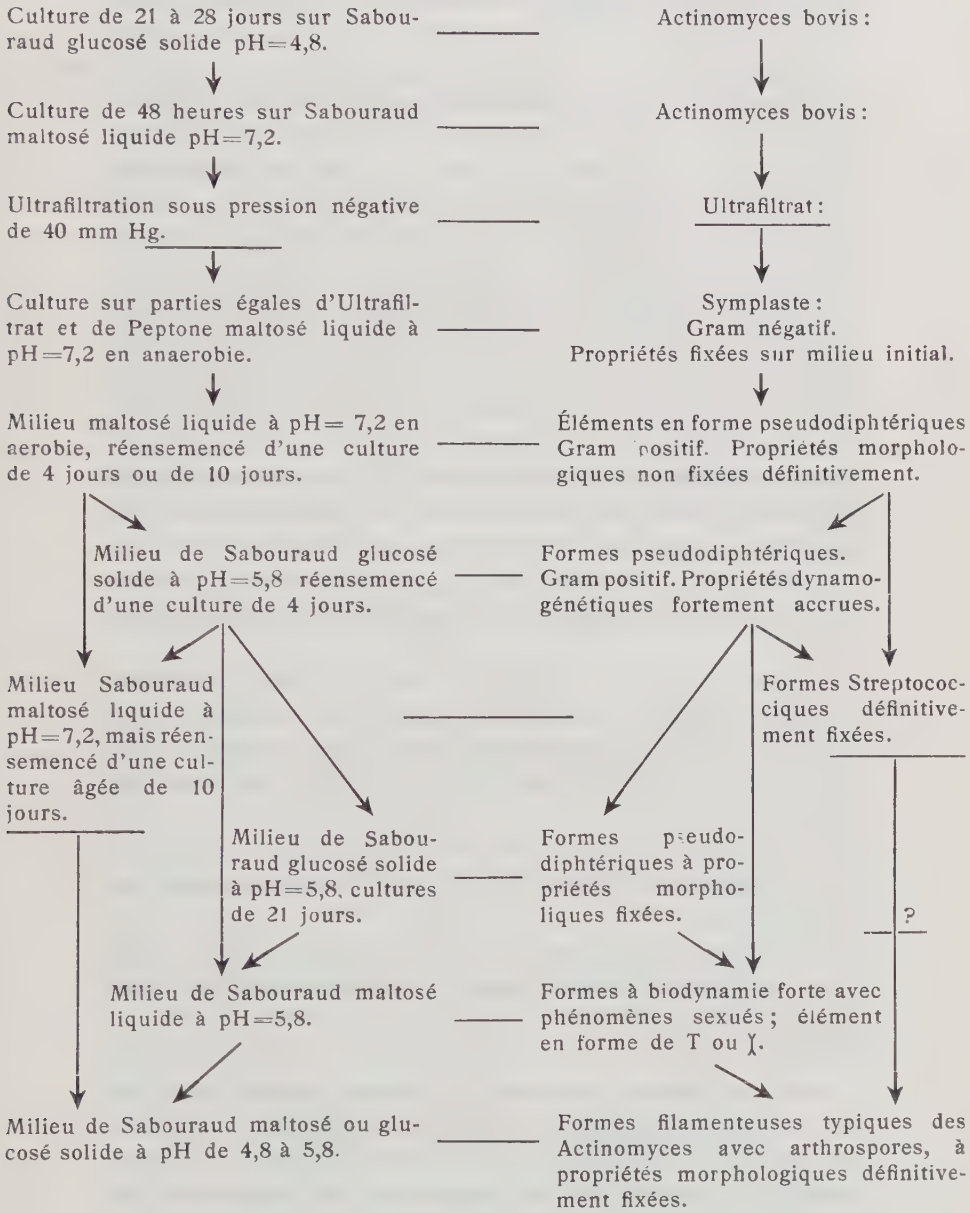
Nous aurons l'occasion de revenir sur ces formes actinomycétiques dans l'étude du pouvoir pathogène des éléments ultrafiltrables de nos *Actinomyces*.

Partant de notre souche à valeur dynamogénétique accru sur milieu de SABOURAUD glucosé solide à pH = 5,8, nous avons ensemencé d'autre part des milieux de SABOURAUD maltosé liquide à pH = 5,8. Dès le 3e jour de culture, le milieu se trouble et les frottis ou les cultures en gouttes pendantes nous permettent de faire les constatations suivantes : les grandes cellules en forme de bâtonnet ou de massue, issues des éléments pseudodiphtériques, renfermant 2 grands corpuscules nucléaires entourés chacun d'une forte calotte de protoplasme, fortement chromophiles et munies d'une double membrane, commencent un accroissement rapide par bourgeonnement des deux extrémités longitudinales. On trouve dans les préparations microscopiques un grand nombre d'éléments en forme « *Clostridium* » avec au centre un grand corpuscule nucléaire. Ces éléments disparaissent très vite pour évoluer vers de petits filaments, fortement ramifiés (Fig. 11).

Ces cultures ensemencées ensuite sur milieu de SABOURAUD maltosé solide de pH = 5,8, donnent finalement des siphons actinomycétiques typiques, qui ne tardent pas à se ramifier et à donner des arthrospores.

On ne peut expliquer ces différentes formes microbiennes décrites qu'en les faisant dériver d'un seul organisme issu de corpuscules ultrafiltrables, évoluant vers des stades différents suivant les conditions d'ultrafiltration, de culture en anaérobiose ou en aérobiose, de propriétés physico- chimiques des milieux et de température.

SCHÉMA.


Culture de 21 à 28 jours sur Sabouraud glucosé solide pH=4,8.
Actinomyces bovis :
Culture de 48 heures sur Sabouraud maltosé liquide pH=7,2.
Actinomyces bovis :
Ultrafiltration sous pression négative de 40 mm Hg.
Ultrafiltrat :
Culture sur parties égales d'Ultrafiltrat et de Peptone maltosé liquide à pH=7,2 en anaerobie.
Symplaste :
Gram négatif.
Propriétés fixées sur milieu initial.
Milieu maltosé liquide à pH= 7,2 en aerobie, réensemencé d'une culture de 4 jours ou de 10 jours.
Éléments en forme pseudodiphtériques Gram positif. Propriétés morphologiques non fixées définitivement.
Milieu de Sabouraud glucosé solide à pH=5,8 réensemencé d'une culture de 4 jours.
Formes pseudodiphtériques. Gram positif. Propriétés dynamogénétiques fortement accrues.
Milieu Sabouraud maltosé liquide à pH=7,2, mais réensemencé d'une culture âgée de 10 jours.
Formes Streptococciques définitivement fixées.
Milieu de Sabouraud glucosé solide à pH=5,8, cultures de 21 jours.
Formes pseudodiphtériques à propriétés morpholiques fixées.
?
Milieu de Sabouraud maltosé liquide à pH=5,8.
Formes à biodynamie forte avec phénomènes sexués ; élément en forme de T ou Y.
Milieu de Sabouraud maltosé ou glucosé solide à pH de 4,8 à 5,8.
Formes filamenteuses typiques des Actinomyces avec arthrospores, à propriétés morphologiques définitivement fixées.

Nous résumons dans le schéma ci-joint les différents stades évolutifs que nous avons pu mettre en évidence dans le cycle évolutif des *Actinomyces* par culture et en partant d'un ultrafiltrat à travers la membrane de collodion sous une pression négative de 40 mm de Hg à la température de + 18°.

Après avoir établi ce schéma, nous tenons à rapporter ici des observations que nous avons pu recueillir dans le traité de Mlle M. A. Beauverie au moment où nos travaux étaient déjà terminés ainsi que la rédaction de notre manuscrit.

Cet auteur distingue d'après Hauduroy les ultravirus proprement dits des formes filtrantes des bactéries : « Ces formes invisibles et filtrantes existent pour tous les germes bactériens ayant un bactériophage actif. On produit le phénomène de d'Herelle en lysant un microbe quelconque par son bactériophage. La lyse étant presque complète, on filtre. Le filtrat porté à l'étuve y reste limpide à 37° pendant 24 heures. On le porte alors à la température du laboratoire. Au bout de quelques mois, on observe l'apparition de cultures anormales d'abord, puis de plus en plus nettes, et, grâce à une technique spéciale, il est possible de revenir à la forme microbienne dont on est parti. Le cycle est ainsi fermé. »

« Pour les ultravirus vrais, il est impossible de réaliser ce cycle, ils sont attirés d'une façon toute particulière par la cellule vivante et seulement par elle (biotropisme), caractère essentiel qui conditionne leurs affinités et leur mode de culture. »

D'après Hauduroy, il faut donc distinguer nettement entre l'ultravirus proprement dit et la forme ultrafiltrante des microbes.

Ces derniers peuvent être cultivés sur milieu artificiel mort, les ultravirus uniquement par les cultures de tissus (Carrel).

« Les inframicrobes ou ultravirus se sont détachés peu à peu des formes microbiennes visibles, tirant peut être leur première origine de ces granulations endogènes, qui caractérisent, dans certains groupes microbiens, celui du bacille diphtérique par exemple, le type le plus actif au point de vue endogène. Pendant un certain temps, les deux formes qui cor-

respondent à deux modes de reproduction ont continué d'exister simultanément, l'une donnant naissance à l'autre et pouvant être restituée par elle; le dernier terme a été l'état dans lequel se présente la plupart des agents pathogènes invisibles, les inframicrobes, êtres devenus si parfaitement autonomes, qu'il n'est plus possible de les rattacher que par notre conception générale aux microbes dont ils sortent. »

« D'après NICOLLE (61) on aurait donc les 3 stades suivants, dans la taille des virus: 1° bactérie, 2° forme filtrante de la bactérie, 3° ultravirus. Les granulations endogènes auxquelles il fait allusion comme origine hypothétique, sont sans doute les granulations métachromatiques, inclusions qui ne pourraient, isolées de la cellule, être susceptibles de multiplication, non plus que de la régénération d'une bactérie. »

Nous avons tenu à insister encore sur ces théories, pour lesquelles notre travail pourrait peut être apporter un peu de lumière.

Retenons tout d'abord que d'après les conceptions d'HAUDUROY les *Actinomyces*, capables d'ultrafiltrer, devraient avoir un bactériophage actif.

D'autre part, nous avons vu que les Actinomyces possèdent des granulations endogènes et même des stades morphologiquement très comparables aux formes diphtériques, que NICOLLE prend comme exemple typique de Bactérie filtrante. Nous avons pu déterminer que, dans le cycle évolutif des *Actinomyces*, il a 3 stades devenant parfaitement autonomes : la forme ultrafiltrante, la forme pseudostreptococcique et la forme filamenteuse adulte. Ces formes ont des caractères si fortement fixés, qu'il faut avoir recours à des artifices tout particuliers pour rompre la « *Mochlose* ». De toute façon, la conception de NICOLLE trouve des appuis très forts dans nos recherches.

Nous concluons de l'ensemble de notre schéma :

1° Il existe des éléments *Actinomycétiques* qui passent à travers les membranes de l'ultrafiltre en collodion.

2° Il existe un cycle évolutif des *champignons microsiphonés actinomycétiques*, caractérisé par les stades suivants que nous avons pu mettre en évidence.

a) Corpuscules ultrafiltrables,

b) Stade « Symplaste »,

c) Stade Pseudodiphtérique,

d) Stade pseudostreptococcique,

e) Stade biodynamogène en forme de T ou de Y,

f) Stade filamenteux à siphon et reproduction par arthrospores.

3° Il existe dans le cycle évolutif des *Actinomyces* trois stades à Mochlolyse (Mochlolyse = ouvrir la « mochlose » = ouvrir le verrou) difficilement réalisables ayant des propriétés morphologiques définitivement fixées : Le stade ultrafiltrant, le stade pseudostreptococcique et le stade filamenteux.

Chapitre III

Observations cliniques de nos deux malades et détermination du parasite microbien.

Avant de commencer la description de nos expériences sur les animaux de laboratoire pour examiner l'effet pathologique des différents stades évolutifs des *Actinomyces* pathogènes, nous tenons à exposer ici les observations cliniques des 2 malades, d'où provenaient les prélèvements pathologiques qui nous ont permis d'isoler l'espèce pathogène employée au cours de notre travail :

Cas I

Observation : Le malade est un vieillard de 80 ans assez débilité par l'âge et affaibli par sa maladie; il n'a pas d'antécédents remarquables. Il y a un an environ il vit se produire et se développer sous la lèvre inférieure et sur la ligne médiane du menton un petit bouton douloureux à la pression. Peu à peu cet élément primaire gagne en extension et se transforme en une tuméfaction rouge, sensible, qui laisse exsuder du pus ou une sérosité. Au bout d'une année, l'évolution de la lésion s'est accentuée; elle a gagné tout le menton; à ce stade, elle suinte abondamment, gêne la parole et la mastication.

Le sujet, célibataire, est peu soigneux de sa personne et s'est peu préoccupé de sa maladie; cependant la gêne qu'elle lui cause, l'amène un jour à l'hôpital où il entre dans un service de chirurgie. L'examen histologique (Fig. 8) des

prélèvements opérés sur les bords de la tumeur décèle des lésions inflammatoires et la culture du pus permet d'obtenir des formes d'*Actinomyces :* à ce moment, il est évacué sur le service du Dr HUFSCHMITT (1).

On constate une tuméfaction rouge foncée, saillante accusant le prognathisme du menton; cette lésion occupe tout le menton d'une commissure labiale à l'autre et empiète sur les joues et sur la région sous-maxillaire. La surface est irrégulière, parsemée de nombreuses saillies nodulaires de dimensions variables, rouges ou pustuleuses; la saillie tumorale projette la lèvre inférieure en avant, sous forme d'une lippe caractéristique. Il faut signaler aussi l'existence d'une importante rhagade que l'on découvre en explorant la tumeur et en soulevant la lèvre inférieure. Cette crevasse débute sous la lèvre, à gauche de la ligne médiane; elle se divise ensuite en deux branches inégales, dont l'une marque la délimination entre la lèvre et la peau, sur une longueur de 2 à 3 centimètres. L'autre affecte grossièrement la forme d'un S, traverse obliquement le menton et vient mourir à droite de la ligne médiane (Fig. 1).

Si l'on supprime au moyen d'un écarteur la lippe de la lèvre inférieure, on remarque l'importance de ces fissures; leur profondeur moyenne est d'un bon centimètre. Les parois sont rouges, granuleuses, tapissées de nombreux îlots jaunâtres. Les poils qui recouvrent la tumeur ont subi partiellement l'éviction. Ceux qui subsistent sont en général atteints de folliculite; celle-ci se traduit par l'émission d'une gouttelette de pus qui se forme après leur extraction. Toute la région est humide et suintante. L'exsudat purulent provient à la fois des crevasses et des pustules folliculaires.

Les limites de la tuméfaction sont assez bien tracées. On remarque pourtant de ci, de là, quelque rares pustules folliculaires aberrantes. Il n'y a aucune réaction inflammatoire de voisinage ganglionnaire ou autre.

(1) Nous prions le Dr. HUFSCHMITT, médecin-chef du Service de Dermatologie de l'Hôpital Municipal de Mulhouse, de recevoir ici l'expression de nos remerciements pour les observations cliniques et le matériel pathologique qu'il a bien voulu mettre à notre disposition.

Cas N° 2.

La malade est âgée de 58 ans.

L'affection débute en juin 1923 par une tuméfaction indolore du maxillaire inférieur droit. Le médecin traitant, ayant posé le diagnostic d'*actinomycose*, traite la malade sans succès au moyen de faibles doses d'iodure.

En décembre 1923, la malade suit un traitement aux rayons X. A cette époque, l'affection avait progressé et formait une tumeur de la grosseur d'une pomme occupant l'angle du maxillaire inférieur droit et une partie de sa branche horizontale. Petit ganglion en dessous de la tumeur. Traitement aux rayons X en décembre 1923. Fin décembre, le diagnostic d'*actinomycose* fut confirmé à la clinique chirurgicale B de l'hôpital civil de Strasbourg (Fig. 2).

En septembre 1929, la tumeur a gagné le maxillaire supérieur. A l'intérieur de la joue, on note une masse bourgeonnante adhérente ; à l'extérieur, la tumeur était ulcérée au centre et laisse sourdre un liquide jaunâtre. L'affection avait à cette époque l'aspect d'une vraie tumeur, mais la biopsie pratiquée le 9 septembre 1929, montrait qu'il ne s'agissait que d'une ulcération inflammatoire banale, sans caractère histologiquement spécifique. Pas de cancer dans les fragments examinés. On ordonne alors de nouveau un traitement aux rayons X; à la suite de ce traitement diminution de la tumeur.

En février 1932, la malade revient avec une tumeur bourgeonnante de la grosseur d'une pomme siégeant sur la joue droite en avant de l'oreille droite. Encore une fois, une biopsie faite le 5. 2. 32 montra qu'il ne s'agissait pas de tumeur maligne, « le fragment examiné ne montre qu'un tissu inflammatoire chronique assez particulier d'aspect avec d'assez nombreuses cellules géantes du type de cellules des granulomes de résorption ».

Entre temps, la pseudotumeur pousse de plus en plus et prend finalement l'aspect que montrent les photographies prises le 3. 2. 32 (Fig. 3 et 4).

Une nouvelle biopsie faite le 10. 2. 32 ne montre aucune transformation cancéreuse : « l'aspect est identique à celui de la biopsie précédente; l'histo-pathologiste pense à un

histiocytome à myéloplaxes; ce serait une pseudo-tumeur hyperplastique d'origine inflammatoire » (Fig. 9).

Nous donnons la description des examens bactériologiques pour les 2 cas par un exposé unique, car dans les 2 cas, l'analyse microscopique et culturale étaient absolument semblables.

Les prélèvements pathologiques tissulaires ont été broyés dans une boîte de PETRI stérile à l'aide d'un pilon stérile en ajoutant 4 à 5 cc^3 de sérum physiologique stérilisé; on effectue des frottis au moyen de ce matériel finement trituré. On colore par la méthode de GRAM et la méthode de ZIEHL-NEELSEN. Dans les 2 cas, on constate l'absence d'éléments acido-résistants, mais on note toujours la présence d'éléments cocciformes et courtes chaînettes de 4 à 8 éléments intracellulaires ou de chaînettes composées d'un nombre plus grand de coques extracellulaires. Ces éléments sont toujours de tailles variables (plus grands que 1 µ) et les chaînettes sont fortement cohérents, de sorte que même le broyage ne les disloque pas. A première vue, on ne pense nullement à la présence d'éléments mycosiques. Ce n'est que la culture qui permet de poser un diagnostic sûr.

Les cultures ont été effectuées avec le même matériel pathologique broyé préalablement. Différents milieux ont été ensemencés et placés en aérobie et en anaérobie à + 37° et à + 27°. Ce n'est que le milieu de Peptone maltosé liquide à pH = 7,2 placé en anaérobie stricte qui donnait un résultat positif. Le milieu se trouble au commencement, il se forme vers le 4e jour un dépôt et le liquide surnageant reste clair. Les frottis à l'aide de ces cultures sont très difficiles à confectionner et microscopiquement, nous n'avons pu trouver aucun élément microbien typique. Par contre, plus tard au cours de nos travaux sur l'ultrafiltration des cultures d'*Actinomyces Bovis* HARZ, nous nous sommes rendus compte que nous avions sûrement affaire avec des formes en « symplastes » que nous n'avions à ce moment pas l'habitude de rechercher ou de caractériser (Fig. 10*a*).

Vu la difficulté de déterminer microscopiquement la nature de ce dépôt cultural qui s'était formé en anaérobiose sur Peptone maltosé liquide, nous avons jugé utile, afin d'éclaircir le problème, de repiquer ce dépôt stérilement sur

de nouveaux milieux. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence sur milieu de SABOURAUD maltosé liquide de pH = 7,2 en aérobie à + 27°, la formation d'un voile jaunâtre, fortement mamelonné et grumeleux.

Microscopiquement au moyen de la méthode de GRAM, nous avons constaté les éléments en chaînettes, simulant des Streptocoques de taille irrégulière. Nous n'insistons pas ici encore une fois sur les caractères et les différenciations essentielles entre ces éléments nettement cryptogamiques et les Streptocoques vrais. Nous avons décrit tous ces détails dans le chapitre précédent et nous rappelons aussi les faits observés par LUCKSCH et HOLLANDE.

Par repiquage successif sur milieu de SABOURAUD maltosé solide à pH = 5,8, nous avons finalement pu fixer les propriétés morphologiques et biologiques des 2 parasites cryptogamiques isolés de nos 2 cas. Ces caractères sont pour les deux cas tout-à-fait identiques et nous résumons comme suit nos recherches :

Propriétés morphologiques et culturales du parasite cryptogamique isolé au cours de nos recherches.

a) Caractères culturaux :

Sur *milieu* de SABOURAUD *glucosé* on obtient des colonies mamelonnées, cratériformes, limitées par une zone peu épaisse, lisse; la couleur est blanc gris à la surface; à la partie inférieure, là où la colonie touche le substrat, présence d'une pigmentation brun-noirâtre.

Sur *gélose* de SABOURAUD maltosée les colonies sont planes, réticulées en certains points, d'une couleur brun-noir; présence d'une zone lisse gris clair. La partie inférieure est noirâtre.

Sur *jus de pomme de terre glycériné*, la croissance, tout en étant un peu moins luxuriante que sur les deux premiers milieux, est cependant satisfaisante.

Le *bouillon gélosé* ne semble pas être très favorable.

En *bouillon liquide* on obtient un voile qui ne tarde pas à former un anneau; le bouillon se trouble; un très léger dépôt se forme; la croissance ne se fait pas en profondeur.

La *gélatine* se liquéfie lentement et progressivement; la zone de liquéfaction est délimitée par une sorte de cupule.

Le *lait* est coagulé au bout d'une dizaine de jours de culture; peu après un éclaircissement du milieu se produit, dû à la peptonisation.

Le *blanc d'œuf* est liquéfié.

Nous pouvons fixer les constantes de culture suivantes : *Optimum cultural :* + 27° à 29°. *Limites de culture :* + 3° à 40°. La concentration optima des milieux en ions H est réalisée pour un pH compris entre 6,8 et 7,2. Les limites permettant encore la croissance sont données par les pH de 4,2 et de 8.

Propriétés biochimiques :

Nous avons examiné le pouvoir fermentatif de l'espèce vis-à-vis des Hydrates de carbone au moyen du tube de Besson, en utilisant le bleu de Bromothymol comme indicateur.

On a pu constater que le champignon assimilait les sucres suivants : Saccharose, Lactose, Maltose, Glucose; ceci sans fermentation. Au commencement de la culture sur ces milieux une forte alcalinité s'installe dans ceux-ci. L'espèce n'assimile aucunement le lévulose et le milieu de culture reste neutre. L'amidon est assimilé et constitue un milieu favorable.

b) Caractères morphologiques :

Filaments nettement ramifiés, mesurant 0,2 μ à 0,85 μ de diamètre. Se fragmentant très aisément. Des articles en forme de bacilles peuvent porter un rameau à structure de baïonnette. Les spores sont communes dans les cultures. Elles ont environ 1 μ de diamètre et plus.

Ces éléments sont tous Gram positifs; ils se colorent facilement par les colorants d'aniline et ne sont pas acido-résistants.

Les cultures âgées dégagent une odeur de moisi très prononcée.

Sur milieux de pomme de terre on peut constater

fréquemment la présence de filaments simulant des lanières de fouet et dans les milieux âgés on trouve des chlamydospores en abondance.

Conclusions : D'après les résultats expérimentaux ainsi obtenus et résumés ci-dessus, nous croyons être en droit de cataloguer le parasite isolé des prélèvements pathologiques provenant de nos malades comme l'*Actinomyces Bovis* HARZ, 1877.

CHAPITRE IV

Le cycle évolutif de l'Actinomyces issu de souche ultrafiltrante dans l'organisme animal.

Pour mener à bien les recherches que nous exposons dans ce chapitre, nous avons employé le procédé de fabrication de sac en collodion indiqué dans le 1er chapitre de nos *Travaux Personnels* et décrit avec quelques modifications par SANARELLI et ALESSANDRINI (54) dans l'étude de l'ultravirus tuberculeux. Les petits sacs de collodion sont fixés à l'embouchure d'une ampoule de 2 cc^3 coupée à cet effet.

Lorsqu'on veut utiliser ces ultrafiltres stérilement préparés, on les sort des éprouvettes, on les débarrasse du sérum physiologique à l'aide d'une seringue à aiguille stérilisée et on les remplit au moyen d'une seringue stérile avec une émulsion de *culture actinomycétique* (0 gr. 05 de culture pesée humide) âgée de 20 jours; celle-ci est obtenue par trituration dans le sérum physiologique dilué au dixième. On scelle l'embouchure de l'ampoule à la flamme et pour avoir toutes garanties, on trempe cette partie dans un mastic liquéfié par chauffage.

Toutes ces opérations doivent être effectuées en prenant le maximum de garanties de stérilité. Ceci fait, on replace les sacs de collodion remplis dans des boîtes de PETRI stériles contenant une petite quantité de sérum physiologique dilué pour éviter la dessiccation. A ce moment on prépare les animaux pour introduire les sacs dans le péritoine.

Nous avons toujours fait usage de cobayes adultes, mâles du poids moyen de 450 grammes qui ont bien supporté

l'implantation des sacs renfermant le parasite; pour nous assurer de la bonne conduite de nos expériences quant à l'asepsie de notre technique, nous avons chaque fois introduit un sac de collodion ne contenant que du sérum physiologique chez un cobaye témoin et pour avoir les garanties de l'imperméabilité et de l'étanchéité des sacs on a utilisé un second cobaye témoin pour chaque lot d'expérimentation; celui-ci subissait l'introduction intrapéritonéale d'un sac de collodion porteur d'une émulsion de *bacille* du *Choléra des poules.*

Chaque expérience comprenait ainsi quatre cobayes, dont deux portaient dans le péritoine l'ultrafiltrat d'*Actinomyces* et les deux autres servaient de témoins. On a employé cinq lots d'animaux pour contrôler les résultats.

L'évolution de l'infection actinomycosique chez les cobayes n'a jamais revêtu un caractère malin; aucun cobaye n'est mort spontanément dans un délai de temps de huit mois à la suite de la mycose même. Pendant les premières six semaines consécutives à l'implantation nous avons constaté un amaigrissement de 100 à 130 grammes, mais ensuite on assistait à un rétablissement ramenant le poids au taux primitif; dans tous les cas les cobayes survivaient. Dans chaque lot, nous avons sacrifié un cobaye entre le 90e et le 100e jour de l'infection et nous en avons effectué l'autopsie. On constatait une réaction péritonéale assez intense; l'ultrafiltre était entouré d'une mince couche d'exsudat fibrineux et il existait une adhérence avec les anses intestinales. Aucun symptôme pathologique autre n'a pu être relevé.

Le deuxième cobaye porteur d'*Actinomyces*, après avoir passé par un stade d'amaigrissement s'est rétabli et aucun symptôme clinique apparent n'a été décelable. Tous les cobayes de cette catégorie ont été sacrifiés entre le 7e et le 8e mois après l'implantation intrapéritonéale. L'aspect anatomique à l'autopsie était à peu de choses près semblable chez les 5 cobayes. On note ici encore une forte réaction localisée au péritoine, à la place de l'intervention chirurgicale. Le péritoine est fort épaissi; la couche fibrineuse est bien organisée et il existe des adhérences étendues avec l'intestin.

Le système lymphatique ne présente aucune anomalie typique; les ganglions rétrolombaires, rétrovésicaux, retrosternaux et mésentériques sont normaux et à peine palpables; les ganglions trachéo-bronchiques, par contre, sont toujours plus volumineux. Les poumons et le foie ont un aspect normal, la rate est généralement légèrement hypertrophiée, mais sans lésions histologiquement déterminables.

Des coupes histologiques pratiquées au moyen des prélèvements effectués au niveau des différents organes n'ont jamais permis de mettre en évidence les éléments parasitaires. En somme l'image anatomique ne présentait à part le processus inflammatoire local au niveau du péritoine, aucun symptôme d'infection mycosique. Chez deux cobayes cependant, les glandes surrénales étaient fortement hypertrophiées et l'urine prélevée à l'autopsie au moyen d'une seringue stérile contenait de l'albumine.

En partant des prélèvements de surrénales, de reins et de quelques ganglions, effectués chez ces cobayes, nous avons pratiqué un broyage du matériel dans le sérum physiologique au moyen du broyeur de *Latapie* avec toutes les garanties d'asepsie; l'extrait organique ainsi obtenu a servi pour effectuer de nouvelles inoculations à quatre autres cobayes. Deux ont été inoculés par voie intrapéritonéale et les deux autres par voie intracardiaque; pour chaque cas, nous avons utilisé 6 centimètres cubes de produit. Les deux cobayes ayant subi l'inoculation intrapéritonéale n'ont présenté aucune anomalie et ont survécu à l'épreuve. Nous donnons dans le résumé suivant les résultats obtenus chez les deux autres animaux : L'un est mort le 196e jour après l'inoculation; il avait présenté un amaigrissement notable (de 560 grammes son poids est tombé à 380 grammes). Vu les résultats anatomiques constatés à l'autopsie, nous avons jugé utile de sacrifier l'autre animal partenaire pour contrôler les expériences.

On constate dans les deux cas une abondante formation de matière séro-sanguinolente dans la plèvre et dans le péricarde; les ganglions bronchiques, maxillaires, rétrosternaux et lombaires sont hypertrophiés ainsi que les ganglions rétrovésicaux. La rate est hypertrophiée, granuleuse, mais sans tubercules apparents. Le foie est parsemé de petits

nodules jaunâtres; les poumons sont congestionnés et oedémateux; les reins ne présentent rien d'anormal; la surrénale montre en général une hypertrophie très accentuée et les urines sont toujours légèrement albumineuses. L'examen histologique nous a montré à un grossissement moyen les caractères suivants : Dans le foie, on constate la présence de nodules disséminés dans le parenchyme hépatique. Il est à noter que ces granulômes ont plutôt tendance à se grouper près des espaces portes ainsi que dans la région sous-capsulaire. Les granulômes tranchent par leur aspect plus clair sur la couleur du parenchyme hépatique. Au fort grossissement, chaque granulôme est formé par des cellules épithélioïdes, disposées sans ordre et mélangées à un petit nombre de macrophages. Dans la moitié de ces granulômes, le centre est franchement nécrotique. En certains endroits, on trouve une disposition des cellules épithélioïdes « en couronne » à direction centripète comme dans les granulômes actinomycosiques. Mais nulle part on ne peut déceler de parasites. Dans quelques nodules seulement présence de cellules géantes. Autour du granulôme il existe une couronne lymphocytaire peu importante. Le parenchyme hépatique est congestionné et dans le voisinage des granulômes on constate la dégénérescence graisseuse ou granulo-graisseuse des cellules (Fig. 6).

En ce qui concerne la rate : examen au grossissement moyen : le tissu splénique est plus profondément touché, il présente un léger bouleversement dans sa structure. Les granulômes sont beaucoup plus fréquents et disposés sans ordre; le centre des nodules est presque toujours nécrotique. Au fort grossissement, autour des centres nécrotiques et contenant des débris cellulonucléaires, on voit des cellules rédiculo-endothéliales en assez grande quantité. La direction de ces cellules est par place centripète. Ces éléments sont mélangés à des fibroplastes et à des lymphocytes, ainsi qu'à des polynucléaires : ces derniers en petit nombre et très souvent à noyau pycnotique. Pas de cellules géantes. Les vaisseaux sont fortement distendus et congestionnés (Fig. 5).

Six ganglions ont été examinés : au fort grossissement, ils présentent une nécrose très importante avec ramollissement et bouleversement assez notable de la structure ganglionnaire. La nécrose au centre du granulôme est, par place,

très nette et on peut distinguer des débris cellulaires et nucléaires. Le granulôme lui-même est très atypique; il est constitué par les mêmes éléments que dans la rate et dans le foie, mais sans aucune disposition typique. Dans le tissu lymphoïde, les sinus sont distendus; il existe une irritation ganglionnaire se traduisant par un léger bouleversement de la structure et par une prolifération peu marquée des éléments réticulo-endothéliaux (Fig. 7).

En résumé, le granulôme est fortement atypique, ressemblant par place au *granulôme actinomycosique*. Les éléments prédominants sont les cellules épithélioïdes et macrophages; très peu de cellules géantes; les polynucléaires se trouvent en quantité variable. Nécrose du centre du granulôme assez abondante, ceci surtout dans les ganglions. Nulle part on ne peut retrouver le parasite.

Les prélèvements effectués sur les ganglions et le foie, après broyage ont été ensemencés d'après la technique de Calmette. On dispose les tubes ainsi ensemencés à l'étuve à + 37° et on constate après un temps variant entre 15 jours et un mois l'apparition de petites colonies réparties sur les parois du tube. L'examen microscopique montre la formation de chaînettes formées par des filaments fortement fragmentés, comparables aux arthrospores des *Actinomyces*. Ces éléments rappellent (sauf leur taille plus élevée et leur disposition plus régulière), des *chaînettes streptococciques*. Nous avons exposé dans un chapitre antérieur l'évolution de ces éléments dans les cultures à la suite de repiquages successifs.

3e *passage par l'animal :*

D'autre part, avec le matériel de broyage provenant des cobayes de deuxième passage, nous avons inoculé deux nouveaux cobayes par lot, toujours par voie intracardiaque, à raison de 6 centimètres cubes par injection. Les résultats obtenus par ce troisième passage sur l'animal ont été dissemblables entre eux dans les cinq lots. Des dix cobayes de troisième passage, deux ont succombé à la suite de maladies intercurrentes. Un cobaye est mort le cinquième jour après l'inoculation intracardiaque et ceci probablement consécutivement à un accident opératoire. Quatre animaux, après avoir présenté des chutes de poids plus ou moins accu-

sées, ont succombé entre le 170e et le 260e jour après l'inoculation, avec des lésions rappelant tout-à-fait celles des cobayes de deuxième passage. Les examens histologique et bactériologique directs n'ont pas permis de mettre en évidence le parasite.

Chez deux autres cobayes qui avaient survécu respectivement jusqu'au 312e et 337e jour après l'inoculation, nous avons, à l'autopsie, constaté une rate et un foie très hypertrophiés, parsemés de nodules en apparence miliaires. Les poumons étaient fortement lésés et portaient des tubercules caséifiés. L'examen direct des prélèvements effectués au niveau de ces tubercules nous a permis de déceler des éléments filamenteux, fortement ramifiés, courts, et se décolorant très facilement par la méthode de GRAM; rarement nous avons pu voir des formes en massues, toujours GRAM négatives, qui montraient à leur extrémité des granulations GRAM positives rappelant la configuration de très petites arthrospores. Jamais il nous a été donné de trouver des chaînettes d'arthrospores typiques.

Les cultures pratiquées avec le matériel broyé dans le sérum physiologique ensemencé suivant la même technique énoncée antérieurement sont toujours restées stériles. Par contre, des milieux de SABOURAUD maltosé liquide à pH = 7,2 placés en anaérobiose stricte dans l'étuve d'ADNET, ont donné un dépôt floconneux, constitué par des petits filaments courts, fortement ramifiés, GRAM négatifs, ressemblant tout-à-fait aux éléments trouvés in situ même. Ces cultures, par repiquages successifs, n'ont jamais évolué d'une autre façon; les tubes placés en aérobiose sont toujours restés stériles.

Le dernier cobaye qui avait survécu a été sacrifié au cours du quatorzième mois de la maladie; l'autopsie ne nous a pas permis de relever des modifications imputables à une infection et les organes étaient d'apparence normale.

4e *passage par l'animal :*

Au moyen du matériel prélevé sur les cobayes de troisième passage chez lesquels nous avions relevé par l'examen direct la présence d'éléments GRAM négatifs, filamenteux, on a, après broyage inoculé à un quatrième lot de deux cobayes par voie sous-cutanée l'extrait obtenu (10 centimètres cubes

mélangés à 0 cc5 d'acide lactique). Il s'est formé au point d'inoculation, après douze jours, un abcès fermé, dur au toucher; celui-ci a évolué très lentement. Le ganglion inguinal le plus proche s'est hypertrophié au commencement mais par la suite il n'a plus été palpable. Les cobayes ne semblaient pas autrement gênés. Le 55e jour l'abcès commence à se fistuliser et laisse sourdre un pus granuleux, brunâtre dans lequel les grains actinomycosiques durs, noirâtres étaient facilement décelables à la loupe dans les préparations. Nous ne jugeons pas utile ici d'insister sur la configuration de ces grains qui présentaient l'aspect typique du *grain actinomycosique*. Les cobayes ont été sacrifiés le 125e jour et l'autopsie ne nous a montré aucune lésion interne. L'abcès énorme était fortement fistulisé et renfermait des *grains actinomycosiques typiques* qui, par la culture et l'examen direct, ont donné tous les caractères d'un *Actinomyces* rentrant dans le sous-genre des *Euactinomyces*, section des *Parasitici*, sous-section des *Majores*, selon la classification de LANGERON.

Dans une communication antérieure, A. et R. SARTORY et J. MEYER ont déjà eu l'occasion de décrire, lors de l'examen des prélèvements effectués sur des lésions actinomycosiques humaines à type inflammatoire banal et à évolution bénigne, les éléments cocciformes disposés en chaînettes qui, à première vue, ne rappellent aucunement l'aspect typique d'un *Actinomyces*. Partant, comme nous l'avons mentionné plus haut, de prélèvements provenant des cobayes de deuxième passage, nous avons, par la culture, grâce à la technique spéciale de CALMETTE encore pu mettre en évidence les mêmes éléments qui, par repiquages successifs et adaptation graduelle au moyen de cultures aérobie et anaérobie ont pris des caractères fixes à forme filamenteuse fragmentée tout d'abord pour évoluer ensuite vers la forme mycélienne typique des *Actinomyces*. Le parasite reste coloré par la méthode de GRAM et montre, par l'examen direct et cultural les caractères de l'*Actinomyces Bovis* HARZ, 1877.

Nous n'insisterons plus ici sur les propriétés morphologiques et biologiques du parasite en étude qui ont été décrites dans un chapitre antérieur plus détaillé. Qu'il nous soit permis de résumer succinctement la marche et les résultats consécutifs de nos différentes recherches :

Matériel pathologique prélevé sur l'homme.

Culture sur milieu spécial d'après la technique de CALMETTE; implantation intrapéritonéale de la culture en sacs de collodion sur le cobaye. Pas de lésions anatomiquement différenciées; réaction localisée au péritoine, adénopathie très peu prononcée, troubles des organes urinaires.

2e passage :

Inoculation intracardiaque du matériel de broyage à des nouveaux cobayes; lésions de la plèvre, du péricarde et du foie; hypertrophie de la rate; l'examen direct bactériologique et histologique ne décèle aucun élément du parasite; culture d'après la technique de CALMETTE donne des éléments cocciformes en chaînettes comparables à des arthrospores.

3e passage :

Inoculation intracardiaque :

Sur dix cobayes, sept sont indemnes ou ne montrent pas d'autres lésions que celles vues sur les animaux de deuxième passage. Un cobaye meurt accidentellement. Deux autres animaux montrent des lésions d'apparence miliaire localisées principalement dans le poumon; présence de filaments mycéliens atypiques ne prenant pas le GRAM.

Cultures à partir de ces organes évoluant seulement en anaérobiose et donnant aussi des éléments GRAM négatifs; ces cultures ont des propriétés définitivement fixées.

4e passage :

Inoculation sous-cutanée en présence d'acide lactique. Les deux cobayes présentent un abcès au point d'inoculation sans adénopathie et sans autres lésions internes apparentes. Ces abcès se fistulisent et donnent naissance à un pus à *grains actinomycosiques typiques*.

En culture, l'évolution d'un *Actinomyces* à propriétés définies et typiques.

La suite de tous les résultats obtenus au cours de nos expériences démontre les faits suivants :

L'*Actinomyces* provenant de cultures pures ou isolé de lésions humaines à évolution bénigne est capable de passer à travers les parois de l'ultrafiltre de collodion.

Les animaux de premier et de deuxième passage ne manifestent aucun symptôme caractéristique d'une *infection actinomycosique.*

L'*Actinomyces* confère par un troisième passage sur l'animal, à celui-ci une *actinomycose atypique ;* le parasite revêt la forme filamenteuse fragmentée, GRAM négative et il est strictement anaérobie.

L'inoculation par voie sous-cutanée du matériel actinomycosique atypique peut conférer au cobaye de quatrième passage une *actinomycose à grains typique.*

Nous avons donc, dans le présent chapitre, au moyen d'ultrafiltres de collodion implantés au cobaye, pu mettre en évidence l'existence de formes ultrafiltrantes de l'*Actinomyces ;* dans un travail antérieur, les mêmes faits ont été observés par A. et R. SARTORY et J. MEYER faisant usage de filtrats obtenus à travers la bougie BERKEFELD L I-bis. L'évolution du parasite jusqu'au stade apte à la production de lésions actinomycosiques typiques se différencie dans les deux cas; elle est plus lente lorsqu'on fait appel aux sacs de collodion chargés du parasite et placés dans la cavité péritonéale.

Il a été donné à ANTONIOLI dans un travail antérieur, de suivre par des microcultures et des techniques de coloration spéciales, l'évolution du parasite allant de la forme mycélienne à filaments longs jusqu'aux formes unicellulaires avec différenciation des éléments chromatiques nucléaires capables de se diviser en deux parties égales, douées d'une sorte d'attraction sexuée d'une valeur dynamique variable suivant les conditions vitales (dynamogénie isoforme ou dynamogénie autogénétique).

Nous avons dans un chapitre antérieur décrit nos recherches culturales et nous avons pu mettre en évidence diverses phases évolutives d'une seule souche d'*Actinomyces* pathogène qui présente une forme ultrafiltrante, évoluant en culture en une forme atypique anaérobie, GRAM négative, une forme en coccis associés en chaînettes paraissant être une sorte d'arthrospores et enfin en une forme typique filamenteuse GRAM positive avec production d'arthrospores.

Les travaux d'Antonioli et nos résultats semblent donc se compléter et prouvent que l'évolution cyclique des *Actinomyces* peut se réaliser dans les 2 sens : de la forme végétative aux éléments ultrafiltrables ou inversement, en passant toujours par des stades atypiques et doués de valeur dynamogène sexuée variable. Les différents *stades actinomycétiques* peuvent continuer d'exister simultanément et peuvent devenir parfaitement autonomes; d'autre part, l'un peut donner naissance à l'autre et pouvant être restitué par lui.

Nos recherches expérimentales sur les animaux sont en parfait accord avec les résultats culturaux et prouvent que les différents stades atypiques des *Actinomyces* peuvent évoluer par passages successifs à travers les animaux vers la forme végétative filamenteuse capable de conférer par inoculation au cobaye une *Actinomycose typique* à grains.

Les mêmes expériences prouvent que les formes évolutives des *Actinomyces* sont capables d'engendrer des maladies à symptômes nettement différenciés de l'image pathologique habituelle des *Actinomycoses à grains.*

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

I. Nous avons au cours de notre travail examiné et pu mettre au point une technique rigoureuse pour la préparation des ultrafiltres en collodion. Nous avons étudié trois procédés d'ultrafiltration. Une première technique est destinée principalement à l'ultrafiltration de substances non altérables par la contamination microbienne et peut être employée avec profit pour les recherches qualitatives et quantitatives d'éléments anorganiques libres dans des solutions colloïdales. Pour ce cas, nous effectuons l'ultrafiltration par pression positive de 40 à 60 mm. de Hg.

La deuxième méthode est mise au point pour l'ultrafiltration de produits bactériens, devant passer la membrane filtrante avec toutes les garanties d'une asepsie stricte. Ici nous avons recours à l'ultrafiltration par pression négative de 40 à 60 mm. de Hg.

La troisième technique pour la préparation d'ultrafiltres a été étudiée pour obtenir la possibilité d'implanter les sacs ultrafiltrants dans les tissus des animaux de laboratoire. Dans ce cas nous avons adapté la technique de Sanarelli et Alessandrini à nos besoins avec plein succès.

II. Après avoir résolu ce problème et ayant eu la garantie que nos procédés d'ultrafiltration répondaient aux conditions scientifiques rigoureuses, nous avons examiné le pouvoir ultrafiltrant de l'*Actinomyces Bovis* Harz in vitro. Nous avons ainsi pu contrôler par notre méthode au moyen de l'ultrafiltre en collodion, les résultats de Lucksch, qui utilisait des bougies de Berkefeld et de Chamberland.

Nos recherches ont abouti aux résultats suivants :

1° Il existe des éléments *actinomycétiques* provenant de cultures âgées sur milieu nutritif, qui passent à travers les membranes de l'ultrafiltre en collodion.

2° L'*Actinomyces Bovis* Harz peut évoluer à travers un cycle caractérisé par les stades suivants, que nous avons pu mettre en évidence :

a) Corpuscules ultrafiltrables,

b) Stade « symplaste »,

c) Stade rappelant morphologiquement le bacille pseudodiphtérique,

d) Stade pseudostreptococcique,

e) Stade à pouvoir dynamogénétique accru, caractérisé par des formes en T ou en Y,

f) Stade filamenteux à siphon et à reproduction par arthrospores.

3° Il existe dans le cycle évolutif des *Actinomyces Bovis* Harz 2 stades à mochlolyse difficilement réalisables, ayant des propriétés morphologiques définitivement fixées : le stade pseudostreptococcique et le stade filamenteux.

III. Nous avons ensuite examiné le pouvoir ultrafiltrant de l'*Actinomyces Bovis* Harz in vivo. Des recherches antérieures aux nôtres ont été effectuées sur les animaux de laboratoire par A. et R Sartory et J. Meyer; mais ces auteurs ont utilisé des filtrats obtenus à travers la bougie de Berkefeld, tandis que nous avons introduit dans le péritoine de cobayes directement des sacs de collodion chargés d'une culture de l'*Actinomyces*.

Les résultats obtenus au cours de ces expériences démontrent les faits suivants :

1° L'*Actinomyces* provenant de cultures pures ou isolé de lésions humaines à évolution bénigne est capable de passer à travers les parois de l'ultrafiltre de collodion introduit dans les tissus animaux.

2° Les animaux de premier et deuxième passage ne manifestent aucun symptôme caractéristique d'une infection actinomycosique.

3° L'*Actinomyces* confère par un troisième passage sur l'animal, à celui-ci une actinomycose atypique, le parasite revêt la forme amorphe de symplaste ou pseudodiphtérique, Gram négative et il est strictement anaérobie.

4° L'inoculation par voie sous-cutanée du matériel actinomycosique atypique peut conférer au cobaye de quatrième passage une *actinomycose typique* à grains et massues.

5° L'évolution du parasite jusqu'au stade apte à la production de lésions actinomycosiques typiques, se différencie dans l'emploi de notre technique par rapport à la technique d'ultrafiltration directe in vitro utilisée par A. et R. Sartory et J. Meyer. L'évolution est plus lente lorsqu'on fait appel aux sacs de collodion chargés du parasite et introduits directement dans la cavité péritonéale des animaux.

IV. Nous avons pu isoler et caractériser à partir des prélèvements pathologiques de deux malades des formes atypiques faisant partie du cycle évolutif de l'*Actinomyces Bovis* Harz. On a pu démontrer que ces formes évolutives ressemblant au bacille pseudodiphtérique ou au streptocoque, occasionnent une maladie simulant des tumeurs ou des lésions à type inflammatoire banal et à évolution bénigne. Ces stades de l'*Actinomyces* sont beaucoup plus réfractaires au traitement iodé ou ioduré. Ainsi un cas a succombé déjà 4 semaines après que le diagnostic a été définitivement posé et malgré qu'on avait appliqué le traitement spécifique. L'autre cas, à caractère beaucoup plus bénin, reste au moyen de la médication iodurée stationnaire depuis 2 ans.

Dans le présent travail, nous avons donc pu mettre en évidence divers stades évolutifs d'une seule souche d'Actinomyces pathogène, qui présente une forme ultrafiltrante, une forme atypique anaérobie, Gram négative, une forme ressemblant au bacille pseudodiphtérique, une forme en coccis associés en chaînettes paraissant être une sorte d'arthrospores à propriétés fixées, et enfin une forme atypique, filamenteuse, Gram positive avec reproduction par arthrospores et capable de conférer par inoculation à l'animal une *Actinomycose typique* à grains et massues.

L'*Actinomyces* pathogène isolé des prélèvements humains, a ainsi pu être examiné morphologiquement et biologiquement et nous avons pu le déterminer comme *Actinomyces Bovis* Harz.

En partant de culture pure d'*Actinomyces Bovis* HARZ issu d'une souche de la mycothèque de la faculté de Pharmacie de Strasbourg (provenant de BAARN), les mêmes expériences in vitro et in vivo ont pu être réalisées et la concordance des faits approuve notre diagnostic et nos conclusions.

NOTES BIBLIOGRAPHIQUES.

15 ALMQUIST : Biologische Forschungen über Bakterienvariationen, Entwicklungszyklus, Sexualität u. s. w. Stockholm, 1925. *Centralbl. f. Bakt.*, I. Abt., Ref. t. 82, p. 41, 1926.

7 ANTONIOLI : Contribution à l'étude des Actinomycoses : *Thèse Doct. Pharm.*, Strasbourg, 1932.

14 BEAUVERIE (Mlle M. A.) : Le vacuome d'une bactérie (Azotobacter). *C. R. Soc. Biol.*, t. 98, 1928, p. 309.

33 BEAUVERIE (Mlle M. A.) : Les maladies à ultravirus des plantes : *Ann. Serv. Bot. Agron. de Tunisie*, t. IX, Lyon, Desvignes, 1932.

46 BECHOLD : Die Kolloide in der Biologie, Leipzig, 1920.

51 BIGELOW : *Ann. Chem. Soc.*, t. 23, 1907, p. 1576 à 1675.

47 BROWN : *Biochm. Journal*, t. 9, p. 591, 1915 et t. II, 1917, p. 40.

4 BRUMPT : Précis de Parasitologie, Masson, Paris 1927.

22 CALMETTE : L'infection bacillaire et la tuberculose chez l'homme et les animaux, Masson, 1928.

41 CALMETTE : *C. R. Soc. Biol.*, 1931, t. CVIII, p. 768.

3 CHALMERS et CHRISTOPHERSON : A Sudanese Actinomycosis. *Annals of tropical med. an parasit.* X. N° 2, 1916, p. 223.

34 DUCLAUX et ERRERA : *Revue générale des colloïdes*, t. II, 1924, p. 130, et t. III, 1925, p. 98.

44 DUCLAUX et ERRERA : *Rev. gén. des colloïdes*, t. II, 1924, p. 130 et t. III, 1925, p. 98.

10 DUCROUX P. : Contribution à l'étude des mycoses osseuses : *Thèse Doct. Pharm.*, Strasbourg 1930.

48 EGGERTH : *Journ. biol. Chim.*, t. 48, 1921, p. 203.

16 ENDERLEIN : Ueber die Rhythmik des Formenwechsels der Bakterien : Sitzungsber. Natur. f. Freunde, 1930, p. 181. Die biologischen Unterlagen der Tuberkulose-Infektion : *Archiv. f. Entw. Gesch. d. Bakt.*, Bd. 1, 1931, p. 53.

18 EVANS : Life cycles in Bacteria : *Jour. of Bacteriol.*, t. XVII, Baltimore, 1929.

24 FERRAN : *C. R. Soc. Biol.* 1913, 74, 21. Les mutations du bacille de KOCH, *Monde Médical*, t. XXXIX, 1929, p. 77.

19 FONTES : Estudos sobre a tuberuloze. Mem. do Inst. Oswaldo Cruz, t. II, 1910, p. 186.

·2 FOULERTON : The streptothrichose and tuberculosis : *Milvoy lecture fur* 1910, London, James Nisbet and Co, 1910.

28 FRAENCKEL et MUCH : Lancet, 1887, I, 757. *Berliner Klin. Woch.* 1908, 45, 691.

52 GEMBERLING : *Journ. Physical. Chem.*, t. 8, p. 674.

20 GESSARD : *Thèse Méd.*, Paris, 1882.

38 HAUDUROY : Les ultravirus, Masson, 1929.

25 HOLLANDE (A. Ch. et G.) : Etudes cytologiques de quelques microbes pathogènes de l'homme; leur cycle évolutif : *Arch. de Zool. exper. et gén.*, t. 72, fasc. 6, 1932, p. 445.

17 HOAG : Variabilität und Lebenszyklen bei den Bakterien. *Verhand. d. Phys. Med. Gesell. Würzburg*, 51 (2) 1926, p. 89 à 92.

58 JOHNSON : The classification of certain virus diseases of the potato. *Wisconsin Sta. Res. Bul.* 87, 1929, p. 24.

9 LACHNER-SANDOVAL : Ueber Strahlenpilze. *Thèse Méd.* Strasbourg 1898.

·1 LANGERON : Les Actinomycoses. *Nouveau Traité de Médecine*, Roger-Widal, Fasc. 4, 2e éd., Paris, Masson, 1925.

42 LE GUYON : Recherches sur l'ultrafiltration en Bactér. Nancy, André, 1932.

8 LEHMANN et NEUMANN : *Bakteriologische Diagnostik*, Vol. 2, München, Lehmanns Verlag, 1912, p. 545.

11 LIESKE : 1) Allgemeines über Aktinomyceten. *Handbuch der Pathog. Mikro-Org.*, Bd. V, 1927-1928.
2) Morphologie und Biologie der Strahlenpilze, Leipzig, 1921.

59 LIESKE : Voir Lieske (11), N° 1.

13 LŒHNIS : Zur Morphologie und Biologie der Bakterien. *Centralbl. f. Bakt. u. Paras.*, Bd. LVI, 1922, p. 529.
LŒHNIS et SMITH : Studies upon the life cycles of the bacteria, Part. II, Life history of Azotobacter : *Centralbl. f. Bakt. u. Par.*, 1923, 23, p. 401.

60 LUCKSCH : Die Filtrierbarkeit der Tuberkelbazillen und anderer Bakterien. *Zentralbl. f. Bakt. u. Par.* I, Orig. Bd. 117, 1930, p. 1.

40 LUMIÈRE et CHEVROTIER : *C. R. Soc. Biol.*, 1924, t. XV, p. 769.

35 MALFITANO : Filtration au travers des sacs en collodion. *Rev. gén. des Sciences*, p. 614, 1908.

36 MANEA : L'ultrafiltration à travers les sacs de collodion des toxines diphtériques et tétaniques. *C. R. Soc. Biol.*, 1904, t. LVI, p. 317.

31 METCHNIKOFF : Voir Roux.

6 MIESCHER : Ueber einen Fall von Mycetoma pedis nostras. *Thèse Méd.*, Basel, 1917. Verlag Braumüller, Leipzig.

5 NEUKIRCH : Ueber Strahlenpilze (Aktinomyceten). *Thèse*, Strasbourg, 1902.

37 NICOLAU : *Bull. Inst. Pasteur*, 1925, t. XXIII, p. 258.

61 NICOLLE : Voir Mlle Beauverie (33).

32 NOCARD, ROUX, BORREL, SALIMBENI et DUJARDIN-BEAUMETZ : Le microbe de la péripneumonie. *Ann. Inst. Pasteur*, 1898, t. II, p. 250.

49 NORTHROP : *Journ. gén. physiol.*, t. II, 1928.

57 QUANJER : Les maladies à virus des plantes cultivées. 2e Congrès intern. de Pathol. comp. Paris, 1931, t. I, p. 339.

27 RABINOWITSCH : *Berl. Klin. Woch.*, 1907, 44, 35.

26 ROMAN : Le bacille tuberculeux, polymorphisme, position systématique. *Thèse Méd.* Lyon, 1930.

31 ROUX et TAURELLI-SALIMBENI : Toxine et antitoxine cholérique. *Ann. Inst. Pasteur*, 1896, t. 10, p. 261.

55 SARTORY (A. et R.) et MEYER (J.) : Deux cas d'actinomycoses invétérées sans grains macroscopiques ou microscopiques dus au même parasite. *Bull. Ac. Méd.* 26, IV, 1932, t. 107, p. 16.

55 *bis* SARTORY A. et R., J. MEYER et ANTONIOLI : Recherches cytologiques sur le développement d'une Microsiphonée. *C. R. Ac. Sc.*, t. 194, p. 2156, 1932.

29 SANARELLI : La causa dell' immunita naturale controil carbouchio. *La Reforme medica*, 1891, vol. 1, p. 121.

30 SANARELLI : La destruction du virus charbonneux sous la peau des animaux sensibles. *Ann. Inst. Pasteur*, 1893, t. 7, p. 82.

54 SANARELLI et ALESSANDRINI : Études sur l'ultravirus tuberculeux. *Ann. Inst. Pasteur*, t. XLVIII, N° 2, février 1932, p. 144.

12 SAUVAGEAU et RADAIS : Sur les genres Cladothrix, Streptothrix et Actinomyces. *Ann. Inst. Pasteur*, t. VI, p. 242 à 273.

45 SCHŒP : *Bill. Soc. Chim. Belge*, t. 24, 1910, p. 354.

56 SCHUMACHER : Ueber den Nachweis des Bakterienkerns. *Centralbl. f. Bakt. u. Par.*, I. Abt. Orig., t. 97, 1926.

39 SIGAUD : Ultrafiltration, dialyse et osmométrie au moyen du sac de collodion. *Ann. Inst. Pasteur*, 1929, t. XLIII, p. 190.

50 TROOST : Traité de Chimie, Masson, 1920, p. 747.

23 VALTIS et CALMETTE : *C. R. Soc. Biol.* 90, 12 janvier 1924, 19.

21 VAUDREMER : Formes filtrantes du Bacille tuberculeux. *C. R. Soc. Biol.*, t. 89, p. 80, 1923.

53 WIDDER : L'action inhibitrice et destructrice des différents antiseptiques sur des champignons cellulophages parasites du papier. *Thèse Doct. Pharm.*, Strasbourg, 1933.

43 ZSIGMONDY et BACHMANN : *Zeitschr. f. Chem.*, t. 103, 1918, p. 119.

TABLE DES FIGURES.

Fig. 1 — Malade : Cas N° 1 (4 semaines avant la mort).

Fig. 2 — Malade : Cas N° 2 (mai 1927).

Fig. 3 — Malade : Cas N° 2 (février 1932), profil.

Fig. 4 — Malade : Cas N° 2 (février 1932), face.

Fig. 5 — Coupe histologique de la rate d'un cobaye du lot de 2e passage de l'Actinomyces ultrafiltré sur l'animal (les granulomes très fréquents sont confluents et leurs centres sont nécrotiques ; les vaisseaux sont fortement distendus et congestionnés). (Gross. 36 ×.)

Fig. 6 — Coupe histologique du foie du même cobaye (nodules disséminés ; les granulomes tranchent par leur aspect plus clair sur la couleur du parenchyme). (Gross. 36 ×.)

Fig. 7 — Coupe histologique d'un ganglion du même cobaye (structure bouleversée avec nécrose très nette au centre du granulome qui est atypique). (Gross. 36 ×.)

Fig. 8 — Coupe histologique de la biopsie du malade N° 1 (lésions inflammatoires sans particularités d'un prélèvement opéré sur les bords de la tumeur). (Gross. 36 ×.)

Fig. 9 — Coupe histologique de la biopsie de la malade N° 2 (pseudotumeur hyperplasique d'origine inflammatoire. Les deux flèches montrent des foyers inflammatoires avec une réaction réticu-

lo-endothèliale et de rares cellules géantes; sur le bord gauche on distingue un foyer d'hyperplasie élastique). (Gross. 72 ×.)

Fig. 10 — Microphotographie de deux symplastes (10 *a* : symplaste dans un prélèvement pathologique; 10 *b* : symplaste d'une culture). (Gross. 2280 ×.)

Fig. 11 — Aspect filamenteux issus de la germination d'éléments en T (Gross. 1710 ×.)

Fig. 12 — Éléments pseudodiphtériques et pseudostreptococciques provenant de cultures issues de l'ultrafiltrat (*a :* pseudostreptocoques; *b :* pseudodiphtériques). (Gross. 1140 ×.)

Fig. 13 et Fig. 14 — Dispositif des appareils employés pour l'ultrafiltration par pression négative dans les conditions de stérilité.

Fig. 15 — Appareils servant à la confection des ultrafiltres en collodion (*a :* mandrins; on remarque sur le deuxième le bouchon de caoutchouc incisé longitudinalement; *b :* tube muni d'un ajutage à robinet servant au décollement de l'ultrafiltre par l'intermédiaire de la trompe à eau; *c :* manchon nu; *d :* manchon pourvu de l'ultrafiltre).

Fig. 16 — Ensemble des appareils pour l'ultrafiltration par pression positive.

Fig. 1

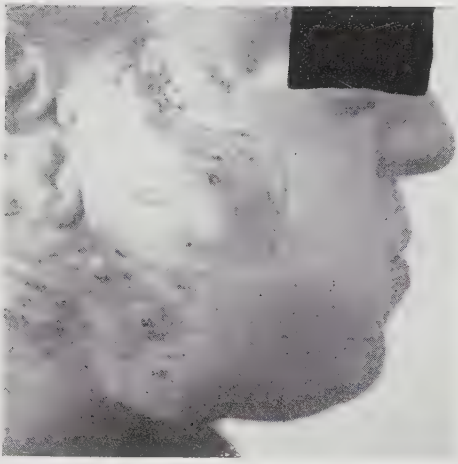


Fig. 2

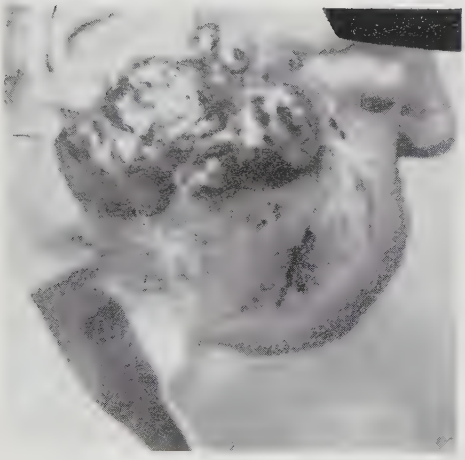


Fig. 3

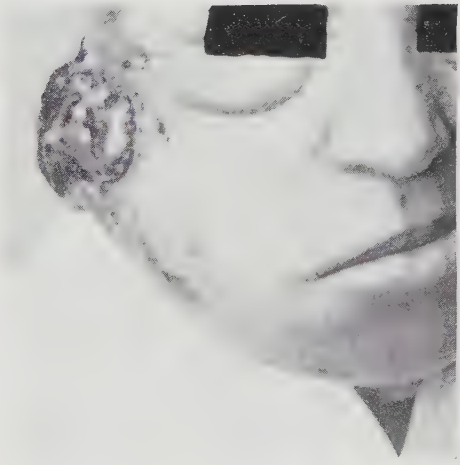


Fig. 4

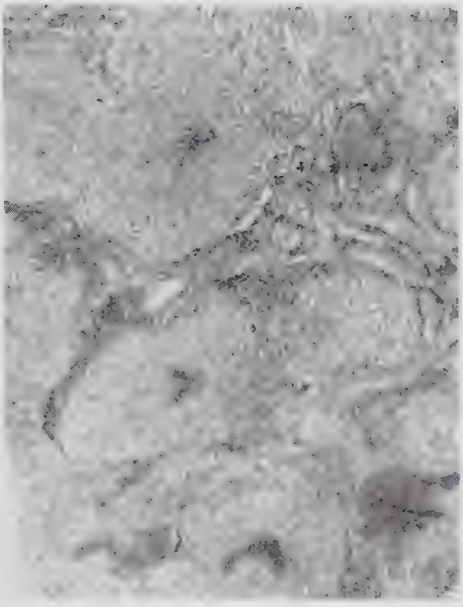


Fig. 5

Fig. 6

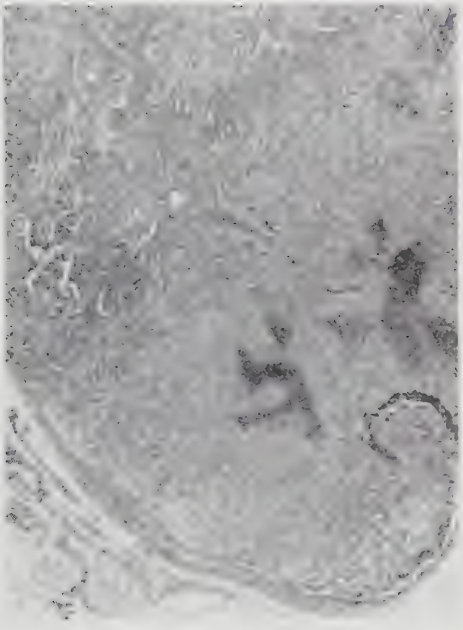


Fig. 7

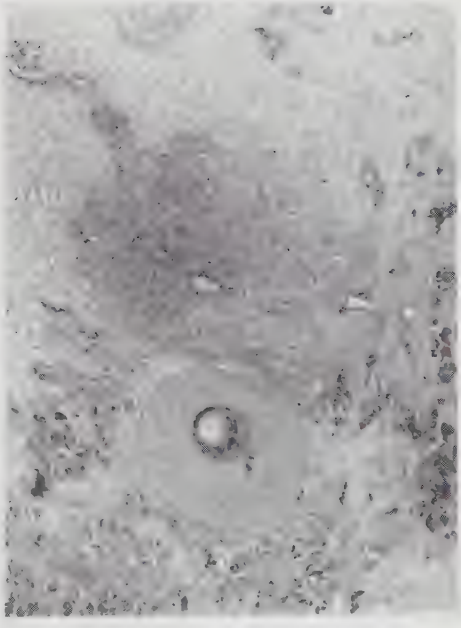


Fig. 8

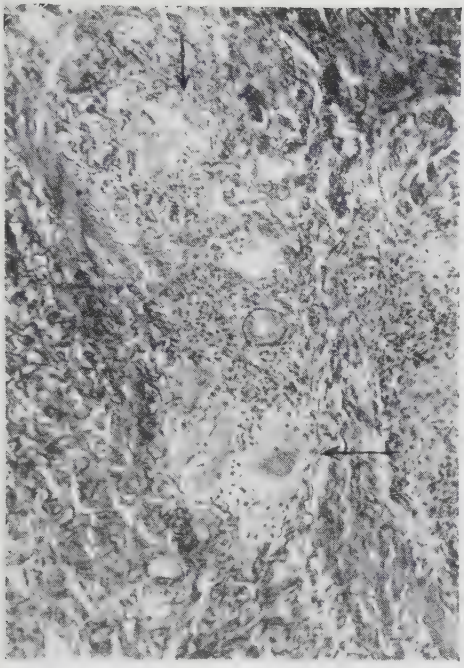


Fig. 9

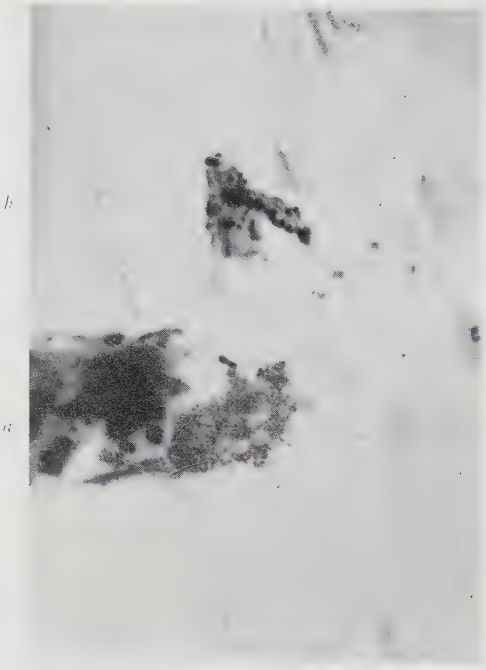


Fig. 10

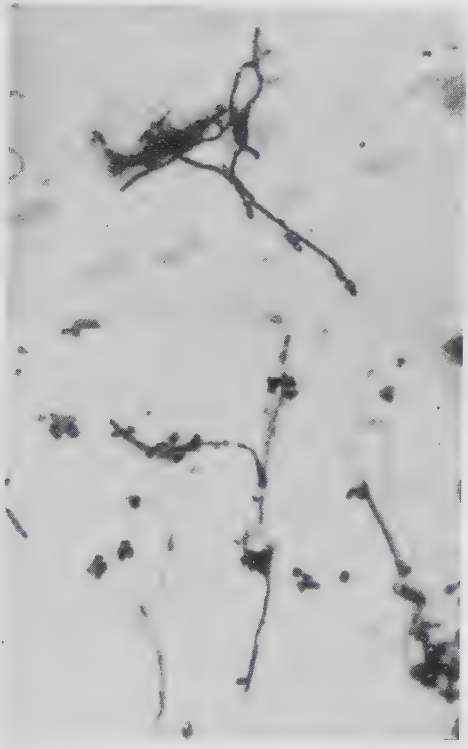


Fig. 11

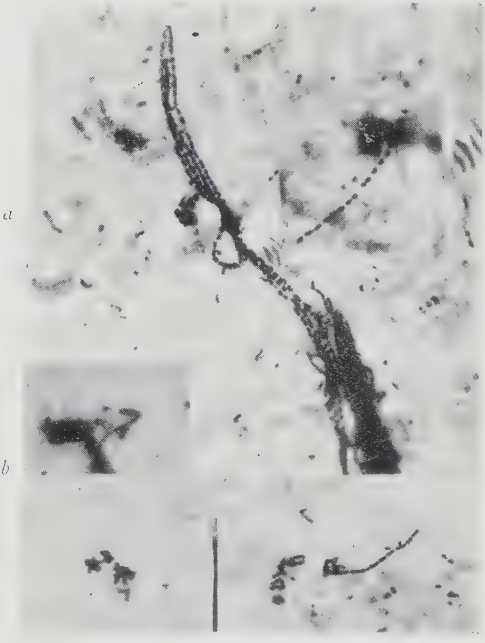


Fig. 12

Fig. 13

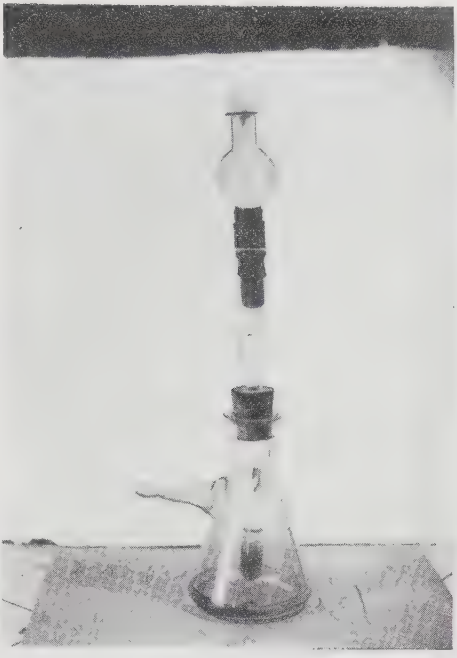


Fig. 14

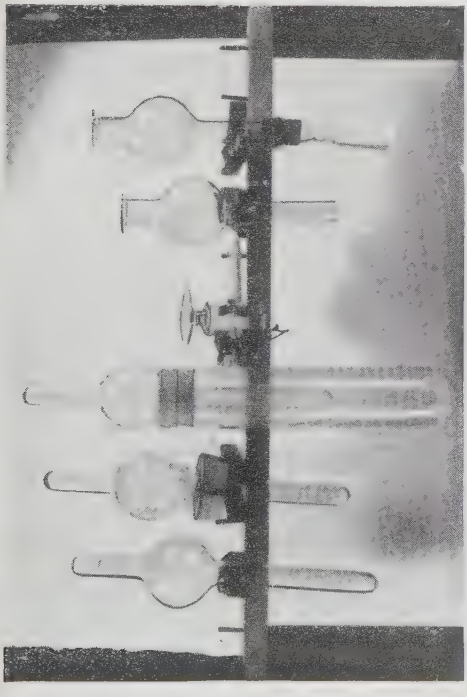


Fig. 15

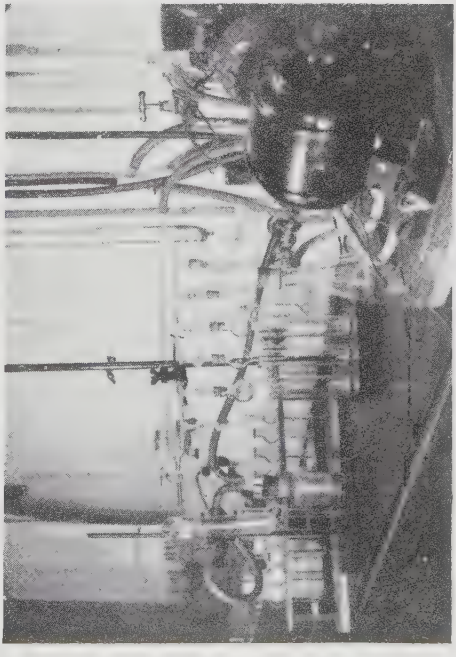


Fig. 16

TABLE DES MATIÈRES.

Introduction 1

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE I. Affinités des Actinomyces dans la classification microbienne. Recherches antérieures sur l'ultrafiltrabilité 5

CHAPITRE II. Recherches antérieures sur l'emploi et la technique de fabrication des ultrafiltres de collodion 25

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE I. Préparation du coton nitré et confection des membranes de collodion d'après nos techniques 33

CHAPITRE II. Le cycle évolutif des Actinomyces dans les cultures pures après passage à travers l'ultrafiltre de collodion 47

CHAPITRE III. Observations cliniques de nos deux malades et détermination du parasite microbien 61

CHAPITRE IV. Le cycle évolutif de l'Actinomyces issu de souches ultrafiltrantes dans l'organisme animal 69

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 79

Notes bibliographiques 83

Table des figures 87

Table des matières 89

Vu :
Strasbourg, le 23 novembre 1933
Le Président du Jury,
A. SARTORY

Vu et approuvé :
Strasbourg, le 24 novembre 1933
Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,
J. E. LOBSTEIN

Vu et permis d'imprimer :
Strasbourg, le 29 novembre 1933
Le Recteur de l'Académie,
Président du Conseil de l'Université
J. DRESCH

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG